



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشت و درمان قزوین

پایان نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی (M.SC)

عنوان:

بررسی فراوانی بتالاکتامازهای با طیف گسترده تیپ های TEM و SHV و تیپ بندی مولکولی آنها به روش

REP-PCR در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان های شهرهای قزوین و تهران

استاد راهنما

دکتر امیرپیمانی

استاد مشاور

دکتر امیر جوادی

نگارش

احسان زارع

سال ۱۳۹۳

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

ای هستی بخش وجود مرا بر نعمات بی کرانت توان شکر نیست ذره ذره وجودم برای تو و نزدیک شدن به تو میتپد
الهی مرا مدد کن تا دانش اندکم نه نردبانی باشد برای فزونی تکبر و غرور نه حلقه ای برای اسارت و نه دست مایه ای برای
تجارت بلکه گامی باشد برای تجلیل از تو و متعالی ساختن زندگی خود و دیگران

لویی پاستور

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه
درخت پر بار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان
در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم .

والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا
که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن
را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند.

به خواهرم که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامش من است.

امیدوارم قادر به درک زیباییهای وجودشان باشم

از استاد گرامیم جناب آقای دکتر پیمانی بسیار سپاسگذارم چرا که بدون راهنمایی های ایشان
تامین این پایان نامه غیرممکن مینمود.

از ریاست محترم گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ، جناب آقای دکتر ناصرپور
بسیار سپاسگذارم که که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه دریغ
ننمودند.

از زحمات بی‌دریغ اساتید گروه، کارشناسان و کارکنان آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی در راستای انجام این پایان‌نامه تشکر و قدردانی می‌کنم.

با تقدیر و تشکر از همکاری صمیمانه آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های کوثر، بوعلی، قدس، شهید رجایی و امام حسین (ع)

فهرست مطالب

۱	بخش اول: مقدمه و کلیات
۳	۱-۱- معرفی و بیان مسئله
۵	۲-۱- خصوصیات سودوموناس آئروژینوزا
۶	۳-۱- تاریخچه سودوموناس آئروژینوزا
۷	۴-۱- تاکسونومی
۷	۴-۱-۱- مورفولوژی و فیزیولوژی
۸	۴-۱-۲- ساختمان غشاء سودوموناس آئروژینوزا
۱۱	۴-۱-۳- زیستگاه
۱۲	۴-۱-۴- ویژگی های کشت
۱۳	۴-۱-۵- رنگدانه
۱۵	۴-۱-۶- ژنتیک
۱۵	۴-۱-۷- ساختمان آنتی ژنیک
۱۵	۴-۱-۸- بیوفيلم
۱۶	۴-۱-۹- کوئروم سنسینگ
۱۷	۴-۱-۱۰- فاکتور های بیماریزایی
۱۹	۴-۱-۱۰-۱- پیل
۱۹	۴-۱-۱۰-۲- ادھزین
۱۹	۴-۱-۱۰-۳- کپسول پلی ساکاریدی
۲۰	۴-۱-۱۰-۴- آلترینات
۲۰	۴-۱-۱۰-۵- اندوتوکسین
۲۰	۴-۱-۱۰-۶- لکوسیدین
۲۰	۴-۱-۱۰-۷- پیوسیانین
۲۰	۴-۱-۱۰-۸- لیپوپلی ساکارید
۲۱	۴-۱-۱۰-۹- آگرو توکسین A
۲۱	۴-۱-۱۰-۱۰- آگرو آنزیم S,T
۲۱	۴-۱-۱۰-۱۱- سیستم ترشحی تیپ III
۲۲	۴-۱-۱۰-۱۲- آنزیم ها
۲۲	۴-۱-۱۰-۱۳- الاستاز
۲۲	۴-۱-۱۰-۱۴- آلکالین پروتئاز

۲۳	۱-۴-۱۰-۱۵-فسفولیپاز C.....
۲۳	۱-۴-۱۰-۱۶-رامنو لیپید.....
۲۳	۱-۴-۱۱-یافته های بالینی.....
۲۴	۱-۴-۱۱-۱-باکتری می.....
۲۴	۱-۴-۱۱-۲-عفونت استخوان و مفصل.....
۲۴	۱-۴-۱۱-۳-عفونت سیستم عصبی مرکزی.....
۲۵	۱-۴-۱۱-۴-عفونت گوش.....
۲۵	۱-۴-۱۱-۵-عفونت چشم.....
۲۵	۱-۴-۱۱-۶-عفونت دستگاه گوارش.....
۲۵	۱-۴-۱۱-۷-اندوکاردیت عفونی.....
۲۶	۱-۴-۱۱-۸-عفونت دستگاه تنفس.....
۲۶	۱-۴-۱۱-۹-عفونت پوست و بافت نرم.....
۲۷	۱-۴-۱۱-۱۰-عفونت دستگاه ادراری.....
۲۷	۱-۴-۱۲-تشخیص آزمایشگاهی.....
۲۷	۱-۴-۱۲-۱-نمونه ها.....
۲۷	۱-۴-۱۲-۲-گستره ها.....
۲۷	۱-۴-۱۲-۳-کشت.....
۲۸	۱-۴-۱۲-۴-جداسازی سویه های سودوموناس آئروژینوزا.....
۲۸	۱-۴-۱۲-۵-اهمیت روشهای مولکولی.....
۲۹	۱-۴-۱۲-۶-بکارگیری PCR.....
۳۰	۱-۴-۱۲-۷-بکارگیری REP-PCR.....
۳۱	۱-۴-۱۲-۸-آزمایش های ژنتیکی و سرولوژیک.....
۳۱	۱-۴-۱۲-۹-سایر روش های تشخیصی.....
۳۱	۱-۴-۱۳-حساسیت نسبت به عوامل مختلف.....
۳۱	۱-۴-۱۳-۱-حساسیت نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی.....
۳۲	۱-۴-۱۳-۲-حساسیت در برابر آنتی بیوتیک.....
۳۲	۱-۴-۱۳-۳-مقاومت دارویی چند گانه در سودوموناس آئروژینوزا.....
۳۳	۱-۴-۱۴-آنتی بیوتیک های بتالاکتام.....
۳۶	۱-۴-۱۴-۱-طبقه بندی بتالاکتامها.....
۳۷	۱-۴-۱۵-مقاومت آنتی بیوتیکی.....
۳۷	۱-۴-۱۵-چگونگی ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی.....
۳۸	۱-۴-۱۶-منشاء مقاومت دارویی.....

۳۸.....	۱-۱۶-۴-۱- منشاء ژنتیکی.....
۳۸.....	۲-۱۶-۴-۱- مقاومت کروموزومی.....
۳۹.....	۳-۱۶-۴-۱- مقاومت خارج کروموزومی.....
۳۹.....	۴-۱۶-۴-۱- منشاء غیر ژنتیکی.....
۳۹.....	۱۷-۴-۱- روش دیسک دیفیوژن آگار.....
۴۰.....	۱۷-۴-۱- تست های تاییدی.....
۴۰.....	۱۸-۴-۱- سایر آنتی بیوتیک ها.....
۴۱.....	۱۹-۴-۱- اپیدمیولوژی.....
۴۲.....	۲۰-۴-۱- درمان عفونت های سودوموناس آئروژینوزا.....
۴۳.....	۲۱-۴-۱- هدف از تحقیق حاضر.....
۴۴.....	بخش دوم: اهداف و فرضیات.....
۴۷.....	بخش سوم: بررسی متون.....
۵۱.....	بخش چهارم: مواد و روش ها.....
۵۲.....	۱-۴-نوع پژوهش.....
۵۲.....	۲-۴-جامعه مورد مطالعه.....
۵۳.....	۳-۴-واحد پژوهش.....
۵۳.....	۴-۴-متغیر ها.....
۵۳.....	۵-۴-روش انتخاب نمونه.....
۵۳.....	۶-۴-روش اجرای پژوهش.....
۵۳.....	۱-۶-۴-جمع آوری نمونه ها.....
۵۴.....	۲-۶-۴-شناسایی و تأیید ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جمع آوری شده.....
۵۴.....	۳-۶-۴-محیط کشت های مورد نیاز.....
۵۴.....	۱-۳-۶-۴-محیط مک کانکی آگار.....
۵۴.....	۲-۳-۶-۴-محیط OF.....
۵۴.....	۳-۳-۶-۴-محیط TSI.....
۵۴.....	۴-۳-۶-۴-محیط SIM.....
۵۵.....	۴-۶-۴-نگهداری ایزوله ها.....
۵۵.....	۵-۶-۴-بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با Disk Diffusion Method.....
۵۵.....	۱-۵-۶-۴-مواد و وسایل مورد نیاز تست آنتی بیوگرام.....
۵۶.....	۲-۵-۶-۴-تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند.....
۵۶.....	۳-۵-۶-۴-کنترل کیفی دیسک ها.....
۵۷.....	۴-۵-۶-۴-روش کار تست آنتی بیوگرام.....

۵۷	۶-۶-۴ آزمایش دیسک ترکیبی جهت تشخیص فنوتیپی ESBLs ها
۵۸	۴-۶-۶-۱- وسایل و مواد لازم
۵۸	۴-۶-۶-۲- روش کار تست غربالگری ESBLs
۵۸	۴-۶-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
۵۹	۴-۶-۷-۱- استخراج DNA
۵۹	۴-۶-۷-۲- ارزیابی کمی DNA استخراج شده
۶۰	۴-۶-۷-۳- مواد مورد نیاز جهت انجام PCR
۶۱	۴-۶-۷-۴- پروسه انجام واکنش PCR
۶۱	۴-۶-۷-۱-۴- مواد و وسایل مورد نیاز
۶۱	۴-۶-۸- تکثیر آنزیم‌های TEM و SHV
۶۱	۴-۶-۸-۱- پرایمرهای مورد استفاده
۶۳	۴-۶-۸-۲- حجم و غلظت مواد PCR جهت تکثیر آنزیم‌های bla _{TEM} و bla _{SHV}
۶۳	۴-۶-۸-۳- برنامه دمایی جهت تکثیر ژن‌های bla _{TEM} و bla _{SHV}
۶۳	۴-۶-۹- آشکارسازی و الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز
۶۳	۴-۶-۹-۱- مواد و وسایل مورد نیاز برای الکتروفورز
۶۴	۴-۶-۹-۲- محلول رنگ آمیزی
۶۴	۴-۶-۹-۳- انجام الکتروفورز و روش تهیه ژل
۶۵	۴-۶-۱۰- تعیین توالی Sequencing
۶۵	۴-۶-۱۱- REP- PCR
۶۶	بخش پنجم یافته ها
۶۷	۵-۱- جمع آوری نمونه ها
۶۷	۵-۲- توزیع فراوانی ایزوله های جمع آوری شده بر اساس جنسیت و نوع نمونه بالینی
۶۸	۵-۳- توزیع فراوانی ایزوله های جمع آوری شده بر اساس بخش جدا شده
۶۹	۵-۴- تأیید ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا
۶۹	۵-۵- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی
۷۰	۵-۱-۵- نتایج آزمون تاییدی تولید ESBL (Combined Disk Method)
۷۱	۵-۶- آزمایش PCR برای جدا سازی ژنهای کد کننده
۷۲	۵-۷- تعیین توالی (Sequencing)
۷۷	بخش ششم : بحث و نتیجه گیری
۸۲	منابع و مآخذ
۹۷	چکیده انگلیسی
۹۸	ضمیمه

فهرست جداول

جدول ۱-۱- گروه‌بندی سودوموناس‌ها بر اساس هومولوژی rRNA و خصوصیات افتراقی	۷
جدول ۱-۲- فاکتورهای بیماری‌زایی مرتبط با سودوموناس آئروژینوزا	۱۸
جدول ۱-۴- متغیرها	۵۲
جدول ۲-۴- پرایمرهای مورد استفاده آزمون PCR	۶۲
جدول ۳-۴- حجم و غلظت نهایی مواد PCR برای ژن‌های <i>bla_{TEM}</i> ، <i>bla_{SHV}</i>	۶۲
جدول ۴-۴- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های <i>bla_{TEM}</i> ، <i>bla_{SHV}</i>	۶۳
جدول ۵-۴- پرایمرهای بکار رفته جهت انجام REP-PCR	۶۵
جدول ۶-۴- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام REP-PCR	۶۵
جدول ۵-۱- جدول فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده بر حسب بخش بیمارستانی	۶۸
جدول ۵-۲- بررسی غربالگری ایزوله‌های مولد ESBL در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا	۷۰
جدول ۵-۳- فراوانی ژنهای <i>bla_{TEM}</i> و <i>bla_{SHV}</i> در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد ESBL	۷۱
جدول ۵-۴- نتایج فراوانی ژنهای <i>bla_{TEM}</i> و <i>bla_{SHV}</i> بعد از تعیین توالی ژنهای کد کننده آنها	۷۲
جدول ۵-۵- توزیع فراوانی نمونه‌های ایزوله‌های حامل ژنهای <i>bla_{TEM}</i> و <i>bla_{SHV}</i> بر حسب نوع نمونه بالینی	۷۴
جدول ۵-۶- توزیع فراوانی ایزوله‌های حامل ژن‌های حامل ژنهای <i>bla_{TEM}</i> و <i>bla_{SHV}</i> بر حسب بخش	۷۵
جدول ۵-۷- نتایج حاصل از آزمون REP-PCR در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد ESBL	۷۵
جدول ۵-۸- فراوانی کلونهای جدا سازی شده در آزمون حاصل از REP-PCR در مراکز بیمارستانی	۷۶
جدول ۵-۹- توزیع فراوانی ژن <i>bla_{TEM}-1</i> در ایزوله‌های متعلق به کلون‌های جدا سازی شده	۷۷
جدول ۵-۱۰- توزیع فراوانی ژن <i>bla_{SHV}-1</i> در ایزوله‌های متعلق به کلون‌های جدا سازی شده	۷۷
جدول ۵-۱۱- توزیع فراوانی ژن <i>bla_{SHV}-12</i> در ایزوله‌های متعلق به کلون‌های جدا سازی شده	۷۷

فهرست تصاویر

تصویر ۱-۱- عفونت زخم سوختگی سودوموناس	۲۶
تصویر ۱-۵- آزمایش‌های فنوتیپی	۶۹
تصویر ۵-۲- تست تاییدی فنوتیپی جهت شناسایی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد ESBL	۷۰
تصویر ۵-۳- ژل الکتروفورز ژن <i>bla_{TEM}</i> و <i>bla_{SHV}</i>	۷۱
تصویر ۵-۴- Alignment ژن <i>bla_{SHV}-1</i>	۷۳
تصویر ۵-۵- Alignment ژن <i>bla_{TEM}-1</i>	۷۳
تصویر ۵-۶- Alignment ژن <i>bla_{SHV}-12</i>	۷۴
تصویر ۵-۷- نتیجه آزمون REP-PCR مربوط به نمونه ای ESBL مثبت در این مطالعه	۷۵

فهرست نمودارها:

- نمودار ۵-۱- توزیع فراوانی نسبی ایزوله‌های جمع آوری شده بر اساس جنسیت..... ۶۷
- نمودار ۵-۲- توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مختلف به کار رفته در این مطالعه..... ۶۸

چکیده

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن های فرصت طلب است که باعث عفونتهای بیمارستانی مانند پنومونی، عفونت ادراری، سپسیس و عفونت زخم و سوختگی می شود. مطالعات متعددی افزایش سریع بتالاکتامازهای وسیع الطیف را در سودوموناس آئروژینوزا نشان می دهد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژنهای *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} با استفاده از روشهای فنوتیپی و مولکولی می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ۲۶۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری از بیمارستانهای شهرهای تهران و قزوین جمع آوری گردید. غربالگری اولیه تمامی ایزوله ها برای تشخیص تولید ESBL به روش دیسک دیفیوژن با توجه به دستور العمل استاندارد انجام شد و سپس تست تاییدی با روش دیسک ترکیبی انجام گرفت. PCR و روش تعیین توالی برای حضور ژن *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} انجام پذیرفت. همه ایزوله ها برای تعیین کلون با روش تایپینگ REP-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: از ۲۶۶ ایزوله بالینی، ۷۵ (۲۸/۶٪) ایزوله الگوی فنوتیپی ESBLs مثبت را نشان دادند. که از این تعداد ۲۰ ایزوله (۲۶/۷٪) حاوی ژن *bla*_{TEM} -۱، و ۵ ایزوله (۶/۷٪) حاوی ژن *bla*_{SHV} -۱، و ۳ ایزوله (۴/۰٪) حاوی ژن *bla*_{SHV}-12 بودند. بررسی نتایج آزمون REP-PCR نشان داد که در مجموع ایزوله های مولد ESBL در این مطالعه متعلق به ۴ کلون بودند که کلون های A (۴۸٪-۳۶) و B (۳۳٪-۲۵) از شیوع بالاتری برخوردار بودند.

نتیجه گیری: با توجه به حضور بتالاکتامازهای با طیف گسترده در بیمارستانهای مورد مطالعه، شناسایی اولیه و پیگیری درمان از عوامل ضروری برای جلوگیری از انتشار بیشتر این ارگانیسم های مقاوم در بیمارستان های مورد مطالعه است. روش درمان مناسب و استفاده منطقی از آنتی بیوتیک ها نیز مهم هستند.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، ESBLs، *bla*_{TEM}، *bla*_{SHV}

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه:

بررسی سیر تحول پیکار با میکروارگانیسم های عفونت‌زا در سده اخیر، از یک سو، بیانگر موفقیت انسان در کنترل عفونت‌ها از طریق تولید آنتی‌بیوتیک های نوین است و از سوی دیگر نشان دهنده تلاش بی‌وقفه طبیعت در بقاء این مخلوقات میکروسکوپی از راه ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها می باشد. کشف داروهای ضد میکروبی بدون شک یکی از مهمترین پیشرفت‌های بشر در زمینه سلامت در طول تاریخ است که تاکنون جان میلیون‌ها نفر را نجات داده است. مقاومت داروهای ضد میکروبی اگرچه مسأله جدیدی نیست، اما هر لحظه رو به خطرناک شدن پیش می‌رود. مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، مختلف و متفاوت بوده، یکی از مهمترین آنها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌هاست که عامل مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث از بین رفتن اثرات آنها و غیر فعال شدن آنها می‌شوند. متالوبتالاکتامازها، از جمله آنزیم‌های بتالاکتامازی هستند که توسط برخی باکتری‌های مقاوم ترشح شده و باعث مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود. این آنزیم‌ها بطور وسیعی در میان باکتری‌ها توزیع شده‌اند و نقش اصلی را در مقاومت ذاتی و اکتسابی باکتری‌ها ایفا می‌کنند. متالوبتالاکتامازها طیف سوبسترای وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز منوباکتام‌ها هستند. این آنزیم‌ها داخل اینتگرون قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمید یا کروموزوم ادغام شوند، لذا قابلیت انتقال به سایر سویه‌های سودوموناس و باکتری‌های دیگر از جمله انترو باکتریاسه‌ها را دارند. اما بطور برجسته و شاخص ژن این آنزیم در سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* به وفور مشاهده می‌شود. آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز، اولین بار سال ۱۹۹۱ در ژاپن از باکتری سودوموناس *آئروژینوزا* گزارش شد. پس از آن از نواحی مختلف دنیا شامل آسیا، اروپا، استرالیا، امریکای شمالی و جنوبی نیز گزارش شده است. در حال حاضر سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* تولید کننده متالوبتالاکتامازها از سراسر دنیا گزارش می‌شود. الگوهای متفاوتی برای طبقه‌بندی آنزیم‌های بتالاکتاماز وجود دارد. یکی از این روش‌ها که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد به وسیله Medeiros Bush- Jacoby- ابداع گردیده است که بر اساس نوع سوبستراها، ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی مانند وزن ملکولی و نقطه ایزوالکتریک بنا شده است. متالوبتالاکتامازها از جمله آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که در گروه ۳ از طبقه‌بندی Bush و کلاس B از طبقه‌بندی Ambler قرار گرفته‌اند، و به

کاتیون‌های دو ظرفیتی (مانند فلز روی) به عنوان کوفاکتور برای فعالیت آنزیمی خود نیاز دارند. امروزه شاهد روز افزون مقاومت‌های باکتریایی و عفونت‌های ناشی از آنها در جهان هستیم. این مسئله یکی از بحران‌های موجود در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌هاست. انتقال و انتشار سریع ارگانیزم‌هایی که قادر به تولید آنزیم‌های مذکورند، باعث بالا رفتن میزان عفونت‌های بیمارستانی مربوط در سراسر دنیا شده است. از جمله باکتری‌هایی که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دخیل است، می‌توان به *سودوموناس آئروژینوزا* اشاره کرد. *سودوموناس آئروژینوزا* یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد و در افرادی که دچار ضعف سیستم ایمنی هستند سبب بیماری‌هایی مانند عفونت گوش میانی^۱، پوستی (به خصوص افراد دچار سوختگی)، باکتری، عفونت مغز استخوان و مفاصل، مننژیت و آبسه‌های مغزی، کراتیت، انتروکولیت، تب شانگهای (مشابه حصه)، اندوکاردیت، پنومونی و عفونت مجاری ادراری می‌گردد. ریشه کن نمودن عفونت‌های ایجاد شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* به دلیل نیازهای تغذیه‌ای کم، مقاومت به محدوده دمایی وسیع و همچنین مقاومت نسبت به مواد ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها، دشوار است.

۱-۱- معرفی و بیان مسئله :

پسودو موناس ائروژینوزا باسیل هوازی گرم منفی است که به عنوان یکی از عوامل عمده عفونت‌های بیمارستانی شامل پنومونی عفونت‌های دستگاه ادراری و باکتری می‌محسوب می‌شود (۱). عفونت بیمارستانی ناشی از پسودو موناس آئروژینوزا بویژه در بیماران دچار نقص ایمنی مانند بیماران نوتروپنیک و بیماران سرطانی شدید تر می‌باشد (۱). در سال‌های اخیر پیدایش الگوهای مختلف مقاومت دارویی در پسودو موناس ائروژینوزا مشکلات فراوانی را جهت درمان بیماران آلوده به ارگانیزم‌های مقاوم ایجاد کرده است (۲ و ۱). با مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، سویه‌های پسودو موناس ائروژینوزای بیمارستانی دارای مقاومت چند گانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها (MDR) در سراسر جهان به طور فزاینده‌ای ظهور و انتشار یافته است (۲). مکانیزم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پسودو موناس آئروژینوزا ممکن است به دلیل ۱- نفوذ ناپذیری غشای خارجی ۲- تغییر در جایگاه هدف ۳- تخریب آنزیمی و یا پمپ‌های افلاکس می‌باشد (۳). نوعی از مقاومت به واسطه تولید آنزیم‌هایی به نام بتا لاکتاماز صورت می‌گیرد که عامل مقاومت در برابر داروهای بتالاکتام است.

^۱Swimmers ear

بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که حلقه بتالاکتام را هیدرولیز و آنتی بیوتیک‌های این خانواده را غیر فعال می‌کنند (۴). بتالاکتامازها در پseudomonas aeruginosa بر اساس طیف اثر بر آنتی بیوتیک‌ها به سه دسته تقسیم بندی شده اند: بتالاکتامازهای با طیف اثر محدود که باعث هیدرولیز پنی سیلین‌ها و سفوپرازون می‌شوند (۴و۵). بتالاکتامازهای طیف گسترده (Extended Spectrum Beta Lactamase) که باعث هیدرولیز مونوباکتام‌ها و سفم‌ها می‌گردند و متالوبتالاکتامازها که بر تمامی بتالاکتام‌های آنتی سودو موناسی به جز مونوباکتام‌ها موثرند. تاکنون بیش از ۳۴۰ آنزیم بتالاکتاماز شناسایی شده است که بر اساس تقسیم بندی Ambler به چهار دسته A تا D تقسیم می‌شوند (۵). در این تقسیم بندی C و A و D شامل بتالاکتامازهای حاوی جایگاه فعال سرین، کلاس B حاوی آنزیم‌هایی که برای فعالیت خود به یون فلز روی نیاز دارند و کلاس D شامل دسته‌ای که دارای تشابه اندکی با آنزیم‌های کلاس A و C هستند (تحت عنوان OXA یا اگزاسیلینازها) می‌باشد (۵و۶). امروزه ۵ نوع ESBL از کلاس A (GES, PER, VEB SHV و TEM) و کلاس D (OXA) در سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده است (۶). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) از بتالاکتامازهای نوع A بوده که به بیشتر آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام نظیر پنی سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل دوم و سوم که دارای زنجیره جانبی اکسی ایمینو هستند (برای مثال سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفی‌پیم و مونوباکتام‌ها (آزترونام)، مقاومت نشان می‌دهند اما در برابر سفامایسین‌ها (سفوکسیتین و سفوتتان) و کارباپنم‌ها (مروپنم یا ایمی پنم) موثر نمی‌باشند (۶و۷). شناسایی ESBLs بر اساس مقاومت به سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفیپیم و توانایی مهارکننده بتالاکتاماز، معمولاً اسید کلولانیک و سولباکتام که این مقاومت را مهار می‌کنند، انجام می‌پذیرد (۷). آنزیم SHV در نمونه‌های بالینی با فراوانی زیاد نسبت به انواع دیگر از ESBL ها یافت می‌شوند. با جایگزینی اسیدهای آمینه در جایگاه فعال این آنزیم انواع مختلفی از بتالاکتاماز SHV به وجود آمده به طوری که تاکنون بیش از ۵۰ نوع از آنزیم SHV در جهان یافت شده است. بتالاکتامازهای مشتق از SHV در انتروباکتریاسه‌ها و شیوع آن در سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر گزارش شده است (۸). SHV-1 به طور عمده بیشتر در کلبسیلا پنومونیه پیدا شده و مسئول ۲۰٪ از مقاومت با واسطه پلاسمید نسبت به آمپی سیلین در این گونه هاست (۹). با جایگزینی اسیدهای آمینه در جایگاه فعال آنزیم بتالاکتاماز TEM-1 انواع مختلفی از بتالاکتاماز TEM به وجود آمده به طوری که تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع آنزیم TEM مورد شناسایی قرار گرفته اند و شیوع آنها در نواحی مختلف دنیا بصورت متفاوت گزارش شده است (۹و۱۰). بتالاکتاماز TEM-1, اولین

بتالاكتامازی بود که به وسیله پلاسمید در انتروباکتریاسه ها کد شد و سایر باکتری ها از جمله سودوموناس آئروژینوزا نیز قادر به تولید آن می باشند (۱۰). TEM-1 قادر به هیدرولیز پنی سیلین ها و سفالوسپورین های اولیه مانند سفالوتین و سفالوریدین می باشد. TEM-2 مشتق اول از TEM-1 می باشد (۱۱). در حال حاضر به سبب حضور بتالاكتامازهای وسیع الطیف در ایزوله های بیمارستان عامل عفونت، شاهد مشکلات فراوان در بحث درمان و کنترل عفونت ناشی از این ارگانیسم ها به ویژه سویه های سودوموناس آئروژینوزا که یکی از عوامل اصلی عفونتهای بیمارستانی است می باشیم. در این راستا این مطالعه به بررسی فراوانی بتالاكتامازهای طیف گسترده TEM,SHV می پردازد.

۱-۲- خصوصیات سودوموناس آئروژینوزا

سودوموناس ها باکتری های گرم منفی میله ای شکل یا اندکی خمیده هستند که توسط یک یا چند تاژک قطبی حرکت می کنند. با این وجود چند سویه نیز تاژک های جانبی با طول متفاوت دارند. متابولیسم باکتری های این خانواده تنفسی بوده و تخمیری نمی باشد. در دماهای بین ۴ درجه تا کمتر از ۴۳ درجه سانتی گراد رشد کرده، شیمیو ارگانو تروف بوده، کاتالاز مثبت و اکسیداز متغیر می باشند، در بین سودوموناس ها تنها سودوموناس آئروژینوزا لیپاز مثبت می باشد. محتوای G+C در ژنوم آنها بین ۶۵ تا ۶۷٪ است. سودوموناسها اغلب به آنتی بیوتیکها، گندزداها، شوینده ها، فلزات سنگین و محلولهای آلی مقاوم هستند (۳-۱). در جنس سودوموناس در گروه فلورسنس، تنها سودوموناس آئروژینوزا^۲، سودوموناس فلورسانس^۳ و سودوموناس پوتیدا^۴ و در گروه غیر فلورسنس سودوموناس استودزری^۵ از نظر پزشکی و بیماریزایی اهمیت دارند. گونه های مهم دیگر از نظر بالینی و پزشکی در جنس های متفاوتی جای داده شده اند. سودوموناس سپاسیا^۶، سودوموناس مالئی^۷، سودوموناس سودومالئی^۸ و سودوموناس پیکرتئی^۹ امروزه در جنس بورخولدريا^{۱۰}

^۲ *P.aeruginosa*

^۳ *P.fluresence*

^۴ *P.putida*

^۵ *P.studzeri*

^۶ *P.cepacia*

^۷ *P.mallei*

^۸ *P.pseudomallei*

^۹ *P.pickerttei*

قرار دارند. سودوموناس دیمینوتا^{۱۱} و سودوموناس وزیکولاریس^{۱۲} در جنس برونیدیموناس^{۱۳} و سودوموناس مالتوفیلیا^{۱۴} تنها عضو جنس استنوتروفوموناس^{۱۵} می باشد (۴). برونیدی موناس دی مینیوتا، برونیدی موناس وزیکولاریس و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا، این باکتری ها انتشار سراسری داشته و در خاک، آب های شیرین و دریا، سطوح گیاهان و جانوران، از جمله انسان یافت می شوند. هم چنین سودوموناس ها قادرند روی سطوح مرطوب تشکیل بیوفیلم دهند(۵).

۱-۳-تاریخچه سودوموناس

در سال ۱۸۵۰ یک جراح فرانسوی به نام Sedillot متوجه شد که در پارچه زخم بند سربازان مجروح چرک سبز-آبی تشکیل می شود. به همین دلیل Gessard در سال ۱۸۸۲ این باکتری جدا شده از زخم را *pyocyaneus Bacillus* نامید. Migula در سال ۱۹۰۰ *Pseudomonas* را به عنوان اسم جنس این باکتری (Pseudes: false; monas: unit) برگزید و آنرا *Pesudomonas pyocyanea* نامید. اما با این وجود نام *aeruginosa* (aeruginosus: Full of copper rust; i.e green) بیشتر مورد استفاده قرار گرفت و به عنوان اسم گونه پذیرفته شد (۶). سودوموناس آئروژینوزا در دهه ۱۹۶۰ به عنوان یک پاتوژن مهم مورد توجه قرار گرفت. علت این امر توانایی این باکتری در ایجاد عفونت در افراد دچار سوختگی، بیماران سیستمیک فیبروزیس و تمام بیمارانی است که سیستم ایمنی آن ها به هر علتی ضعیف شده است. امروزه سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک باکتری عامل عفونت های بیمارستانی مورد توجه می باشد. همچنین با توجه به پتانسیل این باکتری برای ایجاد مقاومت در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک ها و توسعه ایزوله های مقاوم به چندین دارو (MDR^{۱۶}) در بیمارستان ها، تأثیر داروهای ضد باکتریایی کم رنگ تر شده است (۷).

^{۱۰} *Burkholderia*

^{۱۱} *P. diminuta*

^{۱۲} *P. versicularis*

^{۱۳} *Brevundimonas*

^{۱۴} *P. maltophilia*

^{۱۵} *Sternotrophomonas*

^{۱۶} Multi-drug Resistance

۱-۴-۲- تاکسونومی

جنس سودوموناس بر اساس هومولوژی rRNA به پنج گروه تقسیم شده است (جدول ۱-۱) و امروزه فقط گروه یک rRNA در جنس سودوموناس باقی مانده است و بقیه در جنس‌های جدیدی طبقه‌بندی شده‌اند (۸).

جدول ۱-۱- گروه‌بندی سودوموناس‌ها بر اساس هومولوژی rRNA و خصوصیات افتراقی (۶)

Table 36.1 Key tests for medically important pseudomonads

rRNA homology group	Species	Distinguishing features
I <i>Pseudomonas</i>	Fluorescent on King's B agar	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (oxidase+) Arginine+, grows at 42 °C not 5 °C
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> (oxidase+) Arginine+, grows at 5 °C not 42 °C
		<i>Pseudomonas putida</i> (oxidase+) Arginine+, grows at 5 °C
	Non-fluorescent	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (oxidase+) Glucose-, motile+
		<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (oxidase+) Glucose-, fructose+
		<i>Pseudomonas stutzeri</i> (oxidase+) NO ₃ +, arginine-, maltose+
II <i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> (oxidase+)	Arginine-, lysine+, R-colistin, gentamicin
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (oxidase+)	Arginine+, lysine-, grows at 42 °C, R-colistin, gentamicin
	<i>Burkholderia mallei</i> (oxidase±)	Arginine+, motile-
	<i>Ralstonia pickettii</i> (oxidase+)	NO ₃ +, arginine-
	<i>Burkholderia gladioli</i> (oxidase-)	Lactose-, lysine-
III <i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i> (oxidase+)	Asaccharolytic
IV <i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i> (oxidase+)	NO ₃ -, arginine-
	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (oxidase+)	Aesculin hydrolysis
V <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (oxidase-)	Maltose+, DNAase+, R-imipenem, gentamicin

Principles and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition Editors Stephen H. Gillespie and Peter M. Hawkey
© 2006 John Wiley & Sons, Ltd

۱-۴-۱- مورفولوژی و فیزیولوژی

سودوموناس آئروژینوزا، متحرک و استوانه‌ای شکل و اندازه تقریبی آن، ۲-۶/۰ میکرومتر است. این ارگانیزم، گرم منفی است و به صورت‌های منفرد، جفتی و گاهی در زنجیره‌های کوتاه وجود دارد. این باکتری دارای کپسول اغزو پلی‌ساکاریدی موکوئیدی است و در بسیاری از محیط‌های کشت، به آسانی رشد می‌کند، گاهی بوی مطبوع یا شبیه انگور یا شبیه Corn taco (نوعی غذای مکزیکی که از آرد ذرت، گوشت و پنیر درست می‌شود) ایجاد می‌کند. بعضی از سویه‌ها، خون را همولیز می‌کنند. این باکتری، کلنی صاف و گرد با فلورسانس سبز رنگ ایجاد می‌کند. رنگدانه غیرفلوئورسنتی آبی‌رنگ آن، پیوسیاین نام دارد که به داخل آگار منتشر می‌شود. سایر گونه‌های سودوموناس‌ها، پیوسیاین تولید نمی‌کنند. بسیاری از انواع سودوموناس

آئروژینوزا، همچنین رنگدانه فلوئورسنتی پیوریدین ایجاد می‌کنند که به آگار، رنگ سبز می‌دهد. بعضی از انواع آن، رنگدانه‌ی قرمز تیره‌ی پیوروبین یا رنگدانه‌ی سیاه پیوملانین تولید می‌کنند (۱ و ۶).

سودوموناس آئروژینوزا چندین نوع کلنی در محیط کشت ایجاد می‌کند. انواع مختلف این باکتری که کلنی‌های متفاوتی دارند، ممکن است کارکردهای بیوشیمیایی و آنزیمی مختلف و الگوهای حساسیت دارویی متفاوت نیز داشته باشند. در کشت‌های تهیه شده از بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، ارگانسیم‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، کلنی‌های موکوئیدی ایجاد می‌کنند. این امر، نتیجه تولید زیاد آلزینات (یک آگزوپلی ساکارید) است. در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، به نظر می‌رسد که آگزوپلی ساکارید، ماده‌ی میان سلولی را می‌سازد که امکان زندگی ارگانسیم به شکل بیوفیلم را ممکن می‌سازد (۱).

علاوه بر این *سودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری هوازی متحرک به وسیله یک فلاژل قطبی می‌باشد که وجود مولکول اکسیژن برای حرکت آن الزامی می‌باشد. رشد بی‌هوازی باکتری تنها در صورت وجود یک جایگزین برای گیرنده نهایی الکترون مانند نیترات یا آرژنین امکان پذیر است. بیشتر گونه‌ها گلوکز و سایر قندها را از مسیر هوازی مصرف و همه گونه‌ها آنزیم سیتوکروم اکسیداز را تولید می‌کنند. این باکتری از نظر بیوشیمیایی بسیار تنوع طلب و توانایی رشد روی بیشتر محیط‌های عادی آزمایشگاه و استفاده از تعداد زیادی از ضدعفونی کننده‌ها به عنوان منبع غذایی را دارد. از دیگر ویژگی‌های *سودوموناس آئروژینوزا* می‌توان به احیای نیترات به گاز نیتروژن و تولید آمونیاک از آرژنین اشاره کرد (۹).

۱-۴-۲- ساختمان غشاء *سودوموناس آئروژینوزا*

بیش از دو دهه است که مشخص شده غشاء خارجی *سودوموناس آئروژینوزا* نفوذ پذیری کمی دارد (حدود ۸٪ در قیاس با اشرشیا کولی). اما قدرت برون ده این باکتری بسیار بالاست، به طوری که می‌تواند ترکیباتی با وزن مولکولی ۳۰۰۰ دالتون را نیز عبور دهد. در صورتی که در اشرشیا کولی تنها مولکول‌های ۵۰۰ دالتونی توانایی برون رفت از غشاء را دارند (۱۰). غشاء خارجی *سودوموناس آئروژینوزا* نفوذپذیری کمی دارد، در حالیکه قدرت تراوشی آن بسیار بالاست. از مهم ترین مولکول‌های تراوشی *outermembrane protein F* (oprF) را می‌توان نام برد که در مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها بسیار مؤثر است. حتی با وجود غشایی با نفوذ

پذیری پایین، آنتی بیوتیک ها می توانند به مقدار کم وارد سلول گردند و به داخل سلول نفوذ کنند. در نتیجه، قدرت نفوذ پذیری این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف کاهش قابل توجهی پیدا می کند و این مسئله ممکن است به دلیل وجود پورین های ویژه در داخل لایه خارجی (cell wall) باکتری باشد. بنابراین این امر نقش مهمی را در مقاومت ذاتی این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف ایفا می کند (۱۱). پروتئین oprD از خانواده بزرگ کانال های اختصاصی غشاء خارجی در باکتری های گرم منفی می باشد (۱۲). oprD پروتئینی با وزن مولکولی ۴۵ تا ۴۹ کیلودالتون در غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا شناخته شده است. ژن کد کننده oprD میان موقعیت ۷۱ و ۷۵ دقیقه در کروموزوم سودوموناس آئروژینوزای PAO1 واقع شده و توسط نوکلئوتید ۱۳۳۲ bp کد می شود (۱۳). این پروتئین مشابه اعضای خانواده پورین هاست، این تشابه از ۴۱ تا ۵۸٪ متغیر بوده و ساختار فضایی کلی سایر پروتئین ها را داراست (۱۴). بر خلاف پروتئین پورین ompF در اشرشیا کولی، کانال تشکیل شده توسط oprD باریک تر بوده که باعث کاهش نفوذ پذیری غشاء خارجی در سودوموناس آئروژینوزا نسبت به اشرشیا کولی می شود (۱۵). علاوه بر کاربایتم ها، oprD به عنوان کانال اختصاصی برای اسید های آمینه بازی و برخی پپتیدهای کوچک عمل کرده و به عنوان پروتئین نیز عمل می کند (۱۳). بر اساس ساختار کریستالی اشعه X، این پروتئین یک منومر ۱۸ شاخه ای با ساختار barrel β است، که از ۹ لوپ تشکیل شده است (۱۶). لوپ های خارجی ۲ و ۳ به عنوان راه ورودی برای اسیدهای آمینه بوده و منطقه ای برای اتصال ایمی پنم تعیین شده است. علاوه بر آن هر حذف یا جایگزینی در لوپ ۲ و ۳ که منجر به تغییر ساختمانی می شود می تواند منجر به مقاومت به ایمی پنم گردد (۱۷). لوپ ۳ احتمالاً یک کانال عبوری در طول oprD برای ایمی پنم است، اما منطقه اتصال مستقیم نیست (۱۳). مکانیسمی که به وسیله آن ایمی پنم به لوپ ۲ متصل شده، سپس از طریق لوپ ۳ عبور می کند هنوز مشخص نیست (۱۶). حذف در لوپ های ۳ و ۴ منجر به عدم بیان oprD در سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کولی می شود (۱۸). لوپ ۱، ۵، ۶، ۷ و ۸ در انتقال ایمی پنم در گیر نیستند. حذف لوپ های ۵، ۶ و ۸ منجر به افزایش حساسیت به بتالاکتام ها، کینولون ها، کلرامفنیکل و تتراسیکلین می شود که نشان دهنده این است که این ۳ لوپ احتمالاً تجمع داخل سلولی برخی آنتی بیوتیک ها را کاهش می دهند (۱۹). مقدار oprD می تواند اولین مکانیسم مقاومت آنتی بیوتیکی باشد که توسط فشار انتخابی کاربایتم ها القاء می شود. در حالیکه مقاومت های دیگر و چندگانه، هنگامی که سودوموناس آئروژینوزای دارای نقص oprD با فشار بیشتر کاربایتم ها مواجه شود می تواند ظاهر

شود. سایر مکانیسم های مقاومت، مانند پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBPs)، همزمان با موتاسیون های oprD، به عنوان مقاومت های اضافه شونده بر کاربایتم ها محسوب می شود. همان طور که فارا و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده اند، PBPs در مقاومت به کاربایتم ها، از طریق اتصال به عوامل ضد میکروبی یا از طریق کاهش تنظیم بیان ژن oprD در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نقش ایفا می کنند (۲۰). اسیدهای آمینه بازی نه تنها به صورت رقابتی در طول کانال oprD منتقل می شوند، بلکه بیان پروتئین oprD را نیز القاء می نمایند. هنگامیکه آرژنین، هیستیدین، گلوتامات یا آلانین به عنوان تنها منبع کربن یا نیتروژن استفاده می شوند، میزان رونویسی oprD، $\frac{3}{5}$ تا $\frac{5}{6}$ برابر نسبت به محیط حداقل که دارای سوکسینات باشد، افزایش می یابد. تنظیم کننده ای که به آرژنین پاسخ می دهد (ArgR) به منطقه ی اپراتور oprD متصل شده و بیان آن را در شکل وابسته به دوز تنظیم می کند. علاوه بر آرژنین، بیان oprD توسط سایر اسیدهای آمینه مانند: گلوتامات، هیستیدین و آلانین از طریق مسیر مستقل غیر وابسته به (ArgR) و ناشناخته تنظیم می گردد (۲۱). فلزهای کمیاب در تنظیم بیان oprD نقش مهمی دارند (۲۲). ایمی پنم در حضور غلظت های کشنده ی روی در سودوموناس آئروژینوزا MIC بالایی دارد. در باکتری تیمار شده با روی مشاهده شده است که بیان پمپ افلاکس افزایش یافته و بیان پروتئین oprD کاهش می یابد. مس می تواند مقاومت به کاربایتم ها را تحت تاثیر قرار دهد. اما مکانیسم مقاومت به کاربایتم القاء شده توسط مس مانند روی نیست، علاوه بر سیستم تنظیمی czcSR، سیستم دو جزئی تنظیمی دیگر، copSR در تحمل سودوموناس آئروژینوزا نسبت به مس درگیر بوده و مسئول کاهش بیان oprD می باشد. بیان oprD توسط تنظیم کننده های دو جزئی مانند copSR، czcSR و parSR و MexT (تنظیم کننده ی پمپ افلاکس) سرکوب می شود. اخیراً، سیستم تنظیمی دو جزئی دیگری به نام parSR توصیف شده که مقاومت به ۵ کلاس آنتی بیوتیکی مانند ایمی پنم، سفپیم، کولیستین، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون ها را در سودوموناس آئروژینوزا القاء می کند. این سیستم تنظیمی به نظر می رسد از طریق افزایش بیان MexXY، کاهش بیان oprD و تغییر Lps ها عمل می کند. سالیلات به عنوان یک اسید ضعیف نفوذ کننده به غشاء شناخته شده، که می تواند سنتز پروتئین های خاصی را در غشاء خارجی برخی از باکتری های گرم منفی سرکوب کند. این ماده می تواند MIC ایمی پنم را تا ۱۶ برابر افزایش داده و بیان oprD را در سطح رونویسی تا $\frac{3}{3}$ برابر کاهش دهد که بسیار مشابه تاثیراتی است که در سوشی با افزایش بیان MexT دیده می شود. و این پیشنهاد دهنده آن است که سالیلات رونویسی oprD

را تا حدودی از طریق MexT سرکوب می نماید(۲۳). بر عکس سالیلات ترکیبات پلی کاتیونی اسپرمین و اسپرمیدین به طور مستقیم کانال oprD را بلوک کرده و MIC ایمی پنم افزایش می دهد(۲۴).

اسیدهای آمینه بازی به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، ArgR یا سایر تنظیم کننده ها را هدایت می کند تا به اپراتور ژن oprD متصل شده و بیان آن را افزایش دهد. بیان oprD توسط تنظیم کننده های دو جزئی مانند copSR، czcSR و parSR و تنظیم کننده های پمپ افلاکس MexT سرکوب می شود. این تنظیم کننده ها هم چنین بیان پمپ های افلاکس خاصی را افزایش می دهند(همان طور که در شکل نشان داده شده است). (مثبت به معنی افزایش و منفی به معنی کاهش است). اسیدهای آمینه بازی می توانند به طور مستقیم با کاربایم ها برای نفوذ از طریق کانال oprD رقابت کنند. برخی مولکول ها مانند اسپرمین و اسپرمیدین می توانند کانال oprD را بلوک کنند و ورود کاربایم ها را تحت تأثیر قرار دهند. سالیلات بیان oprD را از طریق تنظیم بیان MexT کاهش می دهند(۱۳).

وجود بتا لاکتاماز های پری پلاسمیک در غشاء و سیستم های تراوشی چند دارویی غشایی مانند RND-OprM-MexAB می توانند از عوامل مهم مقاومت ذاتی این باکتری به شمار روند(۱۱).

۱-۴-۳-زیستگاه

Costerton & Anwar سودوموناس آئروژینوزا را فراوانترین شکل موجود زنده روی زمین نامیدند. این ارگانیسم از محیطهای مختلفی مانند آب، خاک، مواد آلی پوسیده، سوخت هواپیماهای جت و محلولهای ضد عفونی کننده جدا شده است که می تواند به دلیل توانایی ارگانیسم برای استفاده از ترکیبات آلی متفاوت و بقاء در حالت فقدان ظاهری مواد غذایی باشد. علاوه بر نواحی آلوده با فاضلاب به ندرت از آب دریا نیز جدا می شود(۳).

انسانهای ناقل سودوموناس آئروژینوزا نادر هستند. با این وجود می توان این باکتری را از مدفوع افراد سالم به میزان ۱-۱۵ درصد جدا کرد که وسعت این دامنه تحت تأثیر رژیم غذایی قرار دارد. به نظر می رسد کلونیزاسیون روده ای در افراد سالم حالتی گذرا دارد و با گذشت زمان سویه باکتری تغییر می کند. Cook & Buck دریافتند که قبل از تشخیص ارگانیسم در مدفوع داوطلبان، آنها باید حداقل یک میلیون سودوموناس

آئروژینوز را بلعیده باشند. ولی این تعداد برای ایجاد عفونت کافی نیست. این مقاومت ذاتی نسبت به عفونت با تجویز آنتی بیوتیک ضعیف می شود و در نتیجه می توان چنین نمود که میزان کلونیزاسیون روده ای با بستری شدن بیمار در بیمارستان به شدت فزونی می یابد و این افزایش همبستگی نزدیکی به طول بستری شدن دارد (۳).

۱-۴-۴ ویژگی های کشت

سودوموناس آئروژینوز به سهولت در روی محیط کشت معمولی باکتریولوژیک رشد می کند و اغلب به وسیله ظاهر کلنی روی آگار مغذی تشخیص داده می شود. معمولاً کلنی های مدور، نامنظم، پخش با قطر ۲-۳ میلی متر، با یک سطح مات و یک ساختار درونی فلوکولار و قوام کره ای تشکیل می دهد (تیپ یک کلنی). در بقیه موارد کلنی های کوچک تر، برجسته و شبیه کلی فرم ها (تیپ دو کلنی) و اشکال ناصاف، کلنی های نافی شکل و برجسته یا کاملاً چین دار (تیپ ۳ کلنی) هم تولید می کنند. کلنی های نوع ۱ و ۲ در محیط مایع سوسپانسیون یکنواخت تشکیل می دهند ولی کلنی های نوع ۳ یک سوسپانسیون گرانولی می سازد (۲ و ۳).

هیچ گونه تفاوت قابل تشخیصی در آنتی ژن های سوماتیک مقاوم به گرما، فاز، باکتریوسین یا حساسیت به آنتی بیوتیک ها در بین انواع کلنی های مشاهده نشده است. برخلاف باکتری های روده ای سویه های دارای کلنی های زبر و ناصاف آنتی ژن های لیپو پلی ساکارید صاف تولید می کنند و با آنتی سرم های آنتی ژن O می توان آن ها را سرو تایپ نمود. تولید یک رنگدانه سبز-آبی که در محیط اطراف پخش می شود وجود سودوموناس آئروژینوز را تأیید می کند، ولی در اغلب محیط کشت ها به جز روی محیط های ویژه ای پیوسیانین تولید نمی شود و برخی به طور کلی آنرا تولید نمی کنند. توانایی تولید پیوسیانین می تواند به طور غیر قابل برگشتی در کشت از دست برود. اغلب کشت های سودوموناس و نه همه آن ها یک بوی میوه ای مشخص دارند که به خاطر تولید O-آمینو استوفنون از تریپتوفان است. روی محیط نوترینت آگار، بسیاری از کشت های سودوموناس آئروژینوز به ویژه کلنی های تیپ ۱ و ۳ نقاط رنگین کمانی با یک جلای فلزی ایجاد می کنند زیرا این نقاط کریستال هایی در کشت قابل رویت است و درون این نقاط ارگانایسم های لیز شده اند. این ضایعات شبیه پلاک روی آگار را Berk در سال ۱۹۶۳ اتوپلاک نامید. او پیشنهاد کرد که یک عامل لیز کننده قابل انتقال مسئول این پدیده است ولی دیگران باکتریوفاژ را علت آن می دانند. مطابق با نظر Zag و Sierrs این اتولیز حاصل تولید

آنزیم‌هایی است که سلول‌های مرده را تجزیه می‌کنند و کریستال‌ها نمک‌های اسیدهای چرب آزاد شده به وسیله اتولیز هستند.

سودوموناس آئروژینوزا به ترکیبات آمونیوم مثل برومید آمونیوم متیل فنیل (سیتیریماید) مقاوم است و از این خصوصیت در اغلب محیط‌های انتخابی برای جدا کردن ارگانیزم از انواع دیگر استفاده می‌شود. آگار سیتیریماید با نالیدیکسیک اسید و ایرگاسان در بازار به صورت تجارتي موجود است ولی برخی ایزوله‌های بیماران سیستمیک فیبروزیس (CF) به شدت به این ترکیبات حساس هستند و روی این محیط رشد نمی‌کنند. براث غنی از استامید برای جدا کردن سودوموناس آئروژینوزا از مدفوع توصیه شده است (۲). سویه‌های موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزا مقادیر فراوانی از یک پلی ساکارید خارج سلولی روی محیط کشت آگار تولید می‌کنند. این پلی ساکارید از نظر شیمیایی شبیه اسید آلژینیک است. یک کوپلیمر دارای بار منفی $D-\beta$ مانورونیک اسید (4 $\beta 1$) و $L-\alpha$ گلوکورونیک اسید می‌باشد و به طور کلی آلژینات نامیده می‌شود.

Briwn, Costerton, و Sturgess در سال ۱۹۷۰ پیشنهاد کردند که آلژینات یک کپسول نرم یا گلیکوکالیس است که در آن میکرو کلنی‌ها به دام می‌افتند و این مشارکت آلژینات و سلول‌های باکتری اساس تشکیل بیوفیلم می‌باشد و باعث محافظت سلول در برابر محیط‌های خارجی مثل کمپلمان، آنتی بیوتیک‌ها می‌گردد. آلژینات در جانوران و انسان آنتی‌ژنیک است و می‌توان آنتی بادی مربوطه را به وسیله تست الیزا و اپسونوفاگوسیتی اندازه گرفت. این پلیمر از نظر آنتی‌ژنی در بین گونه‌ها حفاظت شده است. آلژینات در سویه‌های غیر موکوئیدی هم تولید می‌شود ولی از نظر انرژی بسیار پرهزینه است. دسته‌ای از ژن‌ها در حداقل سه لوکوس کروموزومی، تنظیم و سنتز آلژینات را کنترل می‌کنند و این‌ها تحت تأثیر فاکتورهای محیطی، فشار اسمزی، دهیدراسیون اتانول، فشار اکسیژن و کمبود نیتروژن هستند. افزایش قدرت یونی ترشحات اگزوکترین بیماران سیستمیک فیبروزیس که به دلیل بالا رفتن یون‌های سدیم کلرید و کلسیم و محدودیت آهن، فسفات، کربن ایجاد می‌شود نیز در ظهور شکل موکوئیدی مؤثر است (۲).

۱-۴-۵-رنگدانه

حداقل تولید چهار رنگدانه مختلف در سودوموناس آئروژینوزا شناخته شده است: پیوسیانین، فلورسئین، پیوروبین و پیومالانین.

Campbell و Eagles در سال ۱۹۸۴ نتیجه گرفتند که Mg^{2+} و SO_4^{2-} و PO_4^{3-} و Fe^{3+} برای تشکیل پیوسیانین اساسی است. Ward, King و Paney در سال ۱۹۵۴ دو محیط کشت A و B را برای تولید مطلوب پیوسیانین و فلورسئین پیشنهاد کردند (۲).

پیوسیانین (N-متیل - ۱ - هیدروکسی فنازین) یک رنگدانه فنازین آبی به وزن Da ۲۱۰ می‌باشد. با اسیدسازی، رنگ آن به زرد و سپس به قرمز تغییر می‌کند. در pH قلیایی بی‌رنگ است. این رنگدانه در کلروفرم محلول است. روی محیط King A به مدت ۵ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۸۰ درصد سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا پیوسیانین تولید می‌کنند. شدت تولید رنگدانه بعد از این که محیط کشت آگار به مدت ۳-۴ ساعت در دمای اتاق (۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد) قرار گیرد، افزایش می‌یابد.

فلورسئین در کلروفرم نامحلول است ولی در آب حل می‌شود و یک رنگ زرد به محیط کشت می‌دهد ولی گاهی اوقات تشخیص آن آسان نیست مگر این که زیر نور ماوراء بنفش بررسی شود. حدود ۷۰ درصد از سویه‌ها این رنگدانه را روی محیط King B تولید می‌کنند. پیووردین سیدروفور فلورسنت بوده که در یک سویه سودوموناس آئروژینوزا مرجع (PAO1) به عنوان یک کروموفور مشتق از ۲ و ۳ دی آمینو ۶ و ۷ دی هیدروکسی کینولون که به یک اکتاپتید متصل شده، شناخته شده است که در شرایط محدودیت آهن بهتر تشکیل می‌شود.

برخی از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا یک رنگدانه قرمز روشن محلول در آب بنام پیوروبین می‌سازند که به طور برگشت‌ناپذیری در غلظت کم اکسیژن به یک شکل بدون رنگ احیاء می‌گردند. پیوروبین یک رنگدانه فنازین غیر محلول در کلروفرم است که به وسیله ۲ درصد از ایزوله‌های بالینی تولید می‌شود که اکثریت آن‌ها از ادرار و خلط بیماران سیستمیک فیبروزیس می‌باشد (۲).

Ogunnariwo و Hamilton-Miller در سال ۱۹۷۵ نشان دادند که اضافه کردن L-D - گلوتامات ۱ درصد تولید پیوروبین را پایدار می‌کند ولی تشکیل پیومالانین را سرکوب می‌کند. این مسئله برای محیط کشت غنی شده با L- تیروزین ۱ درصد برعکس می‌باشد. پیومالانین یک رنگدانه قهوه‌ای مایل به سیاه نادر است و کمتر از ۱ درصد سویه‌ها آن را تولید می‌کنند. پیومالانین از نظر شیمیایی ارتباطی با ملانین جانوری ندارد (۲).

۱-۴-۶-ژنتیک

بیماری زایی متنوع سودوموناس آئروژینوزا نشان می‌دهد که این باکتری دارای ژنوم منحصر به فردی است. تعیین توالی ژنوم ۲۰۰۰ سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفته نشان می‌دهد ژنوم آن‌ها از ۶/۳ میلیون جفت باز در ۵۵۷۰ ژن تشکیل شده است. ۸/۴٪ از این ژن‌ها، ژن‌های تنظیمی را شامل می‌شود و سودوموناس آئروژینوزا را با بیشترین تعداد ژن‌های اختصاصی برای تنظیم یک باکتری بیماری‌زا و سازگارپذیر، در محیط‌های نامساعد می‌سازد. کروموزوم این باکتری غنی از G+C (۷۰-۵۰ درصد) می‌باشد ۱۰٪ از ژنوم آن متغیر است که در جزایر سازمان می‌یابد. جزایر فاکتورهای بیماری‌زای شناخته شده از جمله ExoU را کد می‌کند، بدین ترتیب این جزایر، جزایر پاتوژنیسته^{۱۷} نامیده می‌شوند که بیشترین تنوع بیماری‌زایی را برای سودوموناس آئروژینوزا فراهم می‌کنند (۲).

۱-۴-۷-ساختمان آنتی‌ژنیک

سودوموناس آئروژینوزا از نظر آنتی‌ژنی گوناگون بوده و دارای انواع آنتی‌ژن‌های H، O و پیلی می‌باشد. تجزیه‌ی آنتی‌ژنی، بر اساس انواع لیپوپلی‌ساکارید O وجود ۱۷ سروتایپ را مشخص کرده که با واکنش آگلوتیناسیون قابل شناسایی‌اند. آنتی‌ژن پروتئینی پوشش خارجی به نام OMP در همه‌ی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد و آنتی‌ژن مشترک گونه محسوب می‌شود. فاز تایپینگ در این باکتری از لحاظ اپیدمیولوژیک و باکتریوسین تایپینگ مانند پیوسین تایپینگ در پی‌گیری انتشار اپیدمیک عفونت‌های بیمارستانی ارزش ویژه‌ای یافته است (۳).

۱-۴-۸-بیوفیلم^{۱۸}

معمولاً باکتری‌ها در طبیعت به صورت به هم چسبیده یافت می‌شوند. اجتماعات به هم چسبیده‌ی سلول‌ها تشکیل بیوفیلم را می‌دهد. باکتری‌های تثبیت شده روی یک سطح همگی به وسیله‌ی یک ماتریکس از مواد پلیمری آلی با منشاء میکروبی (اگزوپلیمر گسترده گلیکوکالیکس) احاطه شده‌اند. این اگزوپلی‌ساکاریدها که بیش از ۹۰٪ وزن خشک بیوفیلم را تشکیل می‌دهند؛ باعث تسهیل اتصال به سطح، تشکیل میکروکلنی و مقاومت

^{۱۷} pathogenesis Island

^{۱۸} Biofilm

به مواد ضد میکروبی می‌شود. ساختار فیزیکی بیوفیلم‌ها از لایه‌های نازک حصیری مسطح تا ترکیبات شبه قارچی متغیر است. در برخی موارد بیوفیلم‌ها با یک گونه باکتری به وجود می‌آید که *monoculture* نامیده شده است، ولی بیوفیلم‌های تشکیل شده بر روی سطوح مخاطی مثل روده، ریه و غیره که بیشتر آمیزه‌ای از گونه‌های گوناگونی از باکتری‌ها می‌باشند را *multiculture* گویند. از ویژگی‌های قابل ملاحظه‌ی زندگی گروهی در قالب بیوفیلم می‌توان به افزایش چشم‌گیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها، حفاظت از استراتژی‌های محیطی از جمله پاسخ ایمنی میزبان، به علاوه سهولت انتقال ژن و اشتراک تولیدات متابولیک در داخل اجتماعات بیوفیلم به دلیل مجاورت نزدیک سلول‌ها اشاره کرد. آلزینات تولید شده توسط باکتری‌های گرم منفی مختلف از جمله *سودوموناس آئروژینوزا* عامل اصلی تولیدکننده‌ی بیوفیلم می‌باشد (۳).

۱-۴-۹- کوئوروم سنسینگ^{۱۹}

مکانیسم ارتباط سلول به سلول در باکتری‌ها و میان‌کنش آن‌ها از طریق تبادل اطلاعات با سایر سلول‌ها کوئوروم سنسینگ نامیده می‌شود. یکی از تفاوت‌های باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت کنترل غلظت سلولی و بیان فاکتورهای بیماری‌زا از طریق سیگنال‌های شیمیایی کوئوروم سنسینگ می‌باشد. از جمله فرآیندهای فیزیولوژیکی تحت کنترل کوئوروم سنسینگ می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

بیولومینسانس، تولید متابولیت‌های ثانویه، تولید آنتی‌بیوتیک، سوارمینگ، تشکیل بیوفیلم، حفاظت از مکانیسم دفاعی میزبان، اسپورولاسیون، تولید فاکتورهای ویروالانس و غیره. کوئوروم سنسینگ نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم دارد، به این دلیل کوئوروم سنسینگ و بیوفیلم مرتبط به هم هستند. سیستم کوئوروم سنسینگ *سودوموناس آئروژینوزا* که از نوع تیپ LuxIR است، ویروالانس *سودوموناس آئروژینوزا* توسط دو سیستم تیپ lux مجزا از هم که *las* و *rhl* نام دارند کنترل می‌شود. نامگذاری این دو سیستم برگرفته از اثرگذاری آن‌ها بر روی تولید الاستاز (*las*) و رامنولپید (*rhl*) است. سیستم *las* و *rhl* در پردازش و تولید فاکتورهای ویروالانس متعددی نقش دارند که عبارتند از: الاستاز، آلکالین پروتئاز، اگزوتوکسین A، رامنولپیدها، پیوسیانین، لکترین‌ها و سوپراکسید دیسموتاز. مولکول‌های سیگنالینگ در سه گروه عمده طبقه‌بندی می‌شوند: آسیل هموسرین لاکتون-

^{۱۹}Quorum sensing

ها^{۲۰} (AHLs)، الیگوپپتیدها و LuxS/autoinducer 2. تیپ‌هایی که از نظر شیمیایی به هم مرتبط اند با ارائه‌ی سیگنالینگ سلول به سلول یک مجموعه‌ی گسترده از مولکول‌های کاملاً متنوع از نظر ساختاری را تشکیل می‌دهد (۶).

۱-۴-۱۰- فاکتورهای بیماری‌زایی

سودوموناس آئروژینوزا، تنها زمانی بیماری‌زاست که به محیط‌هایی از بدن که بدون دفاع طبیعی هستند وارد شود، مانند وقتی که لایه‌های مخاطی و پوست با آسیب مستقیم بافتی گسیخته شده باشند. وقتی کاتترهای داخل وریدی یا ادراری استفاده می‌شود یا وقتی نوتروپنی وجود دارد، آنچنان که در شیمی‌درمانی در سرطان‌ها ایجاد عفونت می‌کند. باکتری به لایه‌های مخاطی یا پوست متصل می‌شود و تشکیل کلنی می‌دهد، به طور موضعی تهاجم کرده و بیماری سیستمیک ایجاد می‌کند. باکتری، فاکتورهای بیماری‌زایی زیادی دارد که شامل ترکیبات ساختمانی، توکسین و آنزیم‌های گوناگون است. بررسی اینکه هر کدام از فاکتورها در بیماری چه نقشی به عهده دارند مشکل است و شواهد نشان می‌دهند که بیماری‌زایی این باکتری چند عاملی می‌باشد (۱ و ۶).

^{۲۰} 2-Acyl-homoserine lactones

جدول ۱-۲- فاکتورهای ویروالانس (بیماری‌زایی) مرتبط با سودوموناس آئروژینوزا

فاکتورهای ویروالانس	کارکرد
کپسول	پلی‌ساکارید موکوتیدی، ادهزین، جلوگیری از کشتار آنتی‌بیوتیک (مانند آمینوگلیکوزیدها)، مهار فعالیت نوتروفیل و لنفوسیت
پیلی	ادهزین
لیپو پلی‌ساکارید	فعالیت اندوتوکسینی
پیوسیانین	تحریک کارکرد مژه، تحریک پاسخ التهابی، واسطه‌ی تخریب بافتی با تولید رادیکال‌های اکسیژن سمی و افزایش ترشح اینترلوکین A
اگزوتوکسین A	جلوگیری از سنتز پروتئین، تولید آسیب بافتی، سرکوب‌کننده‌ی ایمنی
اگزوتوکسین S	جلوگیری از ساخت پروتئین، سرکوب‌کننده‌ی ایمنی
سایتوتوکسین (لوکوسیدین)	سایتوتوکسیک برای غشاهای یوکاریوت (مانند تخریب عملکرد لوکوسیت، ایجاد آسیب مویرگ‌های ریوی)
الاستاز	تخریب بافت‌های حاوی الاستین (مانند رگ‌های خونی، بافت ریه، پوست)، کلاژن، ایمونوگلوبولین‌ها و فاکتورهای کمپلمان
آلکالین پروتئاز	تخریب بافتی، غیرفعال کردن اینترفرون و فاکتور نکروز دهنده‌ی توموری آلفا
فسفولیپاز C	همولیزین حساس به حرارت، واسطه‌ی تخریب بافتی، تحریک پاسخ التهابی
رامنولیپید	همولیزین مقاوم به حرارت، تخریب بافت‌های حاوی لسیتین، ممانعت از فعالیت مژه‌های ریوی

۱-۴-۱۰-۱-پیلی:

پیلی ها باعث اتصال باکتری به سطح سلول های اپیتلیال می شوند. گفته می شود عفونت ناشی از این باکتری در ریه بیماران سیستمیک فیبروزیس به وسیله پیلی استقرار میابد (۲۵).

۱-۴-۱۰-۲-ادهزین^{۲۱}

چسبیدن سودوموناس آئروژینوزا به سلول های میزبان، توسط پیلی و عوامل دیگری غیر از پیلی صورت می گیرد. پیلی در اتصال به سلول های اپیتلیال مهم بوده و دارای ساختاری مشابه با پیلی نیسریاگنوره^{۲۲} است. سودوموناس آئروژینوزا هم چنین نورآمینیداز تولید می کند که باقیمانده های سیالیک اسید را از رسپتورهای پیلی حذف می کند و موجب افزایش اتصال باکتری به سلول های اپیتلیال می شود. عوامل دیگری غیر از پیلی در سطح باکتری نیز در اتصال سودوموناس به سلول میزبان مهم هستند اما ویژگی های آن ها هنوز به خوبی بررسی نشده است (۹).

۱-۴-۱۰-۳-کپسول پلی ساکاریدی

باکتری کپسول پلی ساکاریدی تولید می کند (بیشتر به عنوان اگزوپلی ساکارید موکوئیدی، لایه ی آلزینات یا گلیکوکالیکس^{۲۳}) که چندین کارکرد دارد. این لایه ی پلی ساکاریدی به عنوان لنگر باکتری به سلول های اپیتلیال و موسین تراکوبرونشیال است. کپسول موجب حفاظت باکتری در برابر فاگوسیتوز شده و ویژگی ضد آنتی بیوتیکی برای برخی آنتی بیوتیک ها مثل آمینوگلیکوزیدها دارد. تولید پلی ساکارید موکوئیدی با مکانیسم های ژنی مختلفی است و ژن کنترل کننده ی تولید پلی ساکارید آلزینات می تواند در بیمارانی مثل بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، یا بیماران مبتلا به عفونت تنفسی مزمن که به مدت طولانی در معرض کلونیزاسیون با سویه های موکوئیدی سودوموناس قرار گرفته اند، دیده می شود (۹).

^{۲۱} Adhesin

^{۲۲} *Neisseria gonorrhoeae*

^{۲۳} GlycoCalix

۴-۱۰-۴-۱-آلژینات

یک ماده پلی ساکاریدی خارجی است که از ترکیب D مانورونیک اسید و L گلوکورونیک اسید با پیوند B) ۴ و ۱) ساخته شده است (۲۶ و ۲۷). باکتری هایی که آلژینات میسازند، موکوییدی میشوند. ساخت این ماده توسط چندین ژن و آنزیم های مختلف کنترل میشود در نتیجه وقوع جهش در ژن های مذکور باعث تنوع در جمعیت باکتری ها میگردد (۲۸).

۴-۱۰-۵-اندوتوکسین

اندوتوکسین لیپو پلی ساکارید در سودوموناس، همانند سایر باسیل های گرم منفی، آنتی ژن اصلی دیواره سلولی است. لیپید A موجب بروز اثرات بیولوژیک فراوانی در سندرم سپسیس می شود (۲۹).

۴-۱۰-۶-لکوسیدین

پروتئینی با وزن مولکولی ۲۷۰۰۰ دالتون است که برای لنفوسیت ها سمی میباشد و مانع فعالیت گلبولهای سفید در انجام فاگوسیتوز میشود، گفته میشود لکوسیدین می تواند پروتئین کیناز C را فعال کند (۳۰).

۴-۱۰-۷-پیوسیانین

پیوسیانین، توکسین آبی رنگی است که توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید شده و ایجاد محصولات سمی اکسیژن مثل سوپراکساید و هیدروژن پراکساید را کاتالیز می کند. در حضور پیوچلین (آهن متصل به سیدروفور) رادیکال های هیدروکسیل بیشتری تولید می شود که موجب آسیب بافتی می شود. این پیگمان، محرک ترشح اینترلوکین A است و منجر به افزایش جذب نوتروفیل ها می شود (۱ و ۹).

۴-۱۰-۸-لیپوپلی ساکارید

لیپو پلی ساکارید سودوموناس آئروژینوزا از بسیاری جهات شبیه LPS آنتروباکتریاسه است. میزان دخالت LPS در سم زائی باکتری مشخص نیست. زنجیره جانبی O این اندو توکسین عامل ویژگی ایمنولوژیک و لیپید A

قسمت سمی مولکول به شمار می رود. LPS این باکتری باعث مقاومت در برابر واکنش کمپلمان سرم انسان می شود و از باکتری در مقابل اپسونیزاسیون و فاگوسیتوز نیز محافظت می کند (۲۹).

۱-۴-۱۰-۹-اگزوتوکسین A

یکی از مهم ترین فاکتورهای بیماری زایی سویه های پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا است. این توکسین با روشی مشابه با توکسین دیفتری، سنتز پروتئین را در سلول های یوکاریوتیک مختل می کند. البته این دو توکسین از نظر ساختمانی و ایمونولوژیکی با هم تفاوت داشته و اگزوتوکسین A از توانایی کمتری نسبت به توکسین کورینه باکتریوم دیفتری^{۲۴} برخوردار است. این توکسین در عفونت های زخمی و عفونت های مزمن تنفسی از عوامل عمده ایجاد تخریب بافتی محسوب می شود (۲۵).

۱-۴-۱۰-۱۰-اگزوآنزیم S و T

اگزو آنزیم S و T، توکسین خارج سلولی هستند که توسط یک سوم از سودوموناس آئروژینوزا ها تولید می شود و از سنتز پروتئین جلوگیری می کند. اگزوتوکسین T و S هر دو آدنوزین دی فسفات (ADP) ریبوزیل ترانسفراز هستند. زمانی که سیستم ترشحی تیپ ۳، پروتئین ها را به داخل سلول های هدف یوکاریوتیک وارد می کند، منجر به آسیب سلول های اپیتلیال و تسهیل انتشار باکتری، تهاجم بافتی و نکروز می شود (۲۵).

۱-۴-۱۰-۱۱-سیستم ترشحی تیپ III

سیستم ترشحی تیپ III (TTSS) در میان یرسینیا، سالمونلا، شیگلا و گونه های سودوموناس به عنوان یک مکانیسم در تزریق مستقیم سموم به سلول های میزبان عمل می کند. سیستم ترشحی تیپ III سودوموناس آئروژینوزا متشکل از ۲۰-۳۰ پروتئین بوده و ساختار شبه پیلوسی داشته که امکان انتقال مستقیم سایتوتوکسین ها را از عرض غشاء باکتریایی به سیتوپلاسم یوکاریوت ها از طریق ساختار سوزن مانند با تشکیل سوراخ در غشاء یوکاریوت ها را می دهد. سه سایتوتوکسین ExoS، ExoT و ExOU به طور متغیر در استرین های مختلف بیان می شود و توسط سیستم ترشحی تیپ III سودوموناس آئروژینوزا به سلول های میزبان تزریق می شود. این سایتوتوکسین ها از ایمنی طبیعی میزبان جلوگیری می کنند (۱۴ و ۳۰).

^{۲۴} *Corynebacterium diphtheriae*

۱-۴-۱۰-۱۲-آنزیم ها

سودوموناس آئروژینوزا آنزیم های مختلفی دارد که ممکن است نقش مهمی را در بیماری زایی این باکتری داشته باشند (۳۱). حداقل سه پروتئاز خارج سلولی کلیدی شامل: الاستاز، پروتئاز قلیایی و پروتئاز IV توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید می شود. بیشتر سویه های این باکتری مولد آنزیم های پروتئولیتیک بوده که قادرند بسیاری از پروتئین ها از جمله کازئین، الاستین و فیبرین را تجزیه کنند. پروتئازها در عفونت های سوختگی اهمیت بیشتری دارند، زیرا باعث آزاد شدن آمینو اسیدها و ترکیبات پپتیدی از بافت سوخته می شوند. هم چنین این پروتئازها فاکتور هاگمن انسانی (پرو آنزیم سرمی) را فعال و سبب التهاب بافتی می گردند (۳۲).

۱-۴-۱۰-۱۳-الاستاز

دو آنزیم به نام های Las A (سرين پروتئاز) و Las B (متالوپروتئاز حاوی روی) با هم فعالیت سینرژیک^{۲۵} دارند موجب تجزیه الاستین شده و در نتیجه تخریب بافت پارانشیمال ریه و بروز ضایعات هموراژیک (اکتیمما گانگرتوزوم) می شوند. این آنزیم ها هم چنین موجب تخریب اجزای کمپلمان و جلوگیری از کارکرد و کموتاکسی نوتروفیل ها و در عفونت های حاد، موجب پیشرفت آسیب های بافتی می گردد. عفونت های مزمن سودوموناس آئروژینوزا با ساخته شدن آنتی بادی علیه Las A و Las B و رسوب کمپلکس های ایمنی در بافت های عفونی مشخص می شوند (۳۴).

۱-۴-۱۰-۱۴-آلکالین پروتئاز

مشابه الاستاز، آلکالین پروتئاز منجر به اختلال بافتی و انتشار سودوموناس آئروژینوزا می شود (۶). این پروتئین از طریق شکستن تعداد متنوعی از پروتئین های میزبان (اینترلوکین ۲ و چندین مولکول ادهزین دیگر) موجب سرکوب سیستم ایمنی و نکروز می شود (۳۵).

۱-۴-۱۰-۱۵-فسفولیپاز C

فسفولیپاز C موجب هیدرولیز ترکیبات لیپیدی و لسیترین غشاء سلولی و تخریب بافت می گردد (۳۰). فسفولیپاز C لسیترین موجود در غشای اریتروسیت ها و در سورفکتانت ریه انسان را تجزیه می کند. آنتی بادی ضد این

^{۲۵} Synergism

آنزیم در سرم بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس باعث افزایش همولیزین رامنو لیپید شده ، پاسخ کیمو تاکتیک لکوسیت ها را تحریک کرده و ویژگی های الکتروشیمیایی اپیتلیوم برونش را تغییر داده و حرکت مژک های تنفسی را مختل می کند. در نتیجه باعث حل شدن لیستین سورفکتانت ریه می شود(۳۲).

۱-۴-۱۰-۱۶-رامنولیپید

سودوموناس آئروژینوزا ۲ گلیکولیپید شبه دترجنت تولید می کند که تحت عنوان رامنو لیپیدها شناخته می شوند: مونو رامنولیپید و دی رامنو لیپید، به نظر می آید این مواد به سودوموناس آئروژینوزا توانایی ایجاد عفونت ریه می دهند، آن ها از طریق تحریک تولید موسین، کشتن ماکروفاژها و جلوگیری از عملکرد سلول های فاگوسیت باعث استقرار و کلونیزه شدن باکتری در ریه می شوند. بیشتر سویه های سودوموناس آئروژینوزا تیپ های مختلفی از پایوسین به نام های R ، S و F تولید می کند. این پروتئین ها دارای دو قسمت هستند که بخش بزرگتر عامل کشندگی سویه های مربوط به گونه های مشابه و بخش کوچک تر عامل ایمنی خود سلول مولد می باشد. لیپازها در اواخر فاز رشد لگاریتمی از باکتری ترشح شده و با LPS باکتری اتصال محکمی دارند. بنابراین بیشتر سویه های سودوموناس آئروژینوزا لیپولیتیک می باشند(۳۲).

۱-۴-۱۱-یافته های بالینی

عفونت های ایجاد شده توسط سودوموناس آئروژینوزا کسب شده از محیط شیوع کمتری دارند و در ارتباط با محیط های مرطوب هستند (۳۵). عفونت های پوستی در ارتباط با آب های داغ در استخرهای شنا و حمام ها، نمونه ای از عفونت های کسب شده از محیط در ارتباط با این باکتری است (۳۶). افرادی که برای مدت طولانی و بدون وقفه از لنزهای تماسی استفاده می کنند به علت ظهور سودوموناس آئروژینوزا در محلول های شستشوی لنز در معرض خطر بالای ابتلا به کراتیت اولسراتیو هستند (۳۷). اوتیت خارجی گوش توسط این باکتری دارای شیوع بالایی است (۳۸). پنجه های پای عفونی شده به علت استفاده از آنتی بیوتیک های موضعی و عفونت ناخن به علت تماس با آب، دترجنت ها و یا آزارهای مکانیکی از عفونت های شایع توسط این باکتری به شمار می رود که به خوبی شناسایی شده است. اندوفتالمیت ایجاد شده توسط این باکتری بعد از عمل جراحی یا وارد شدن ضربه به چشم یک عفونت جدی به شمار می رود. اندوکاردیت معمولاً در معتادان تزریقی گزارش می شود (۳۹ و ۴۰).

عفونت بیمارستانی حاصل از سودوموناس آئروژینوزا معمولاً در رابطه با کسب این ارگانیسم از طریق سیستم های تهویه، درمان آنتی بیوتیکی و یا عمل جراحی است. این باکتری در تعداد کمی از انسان ها به صورت فلور نرمال پوست مشاهده می شود و به نظر می رسد که سودوموناس آئروژینوزا از طریق بیماران دارای این منبع باکتری به بخش مراقبت های ویژه وارد می شود (۴۱). بیماران دارای زخم های سوختگی شدید در معرض بیشترین خطر برای ابتلا به این باکتری ها هستند اما امروزه در بیمارستان های سوختگی پیشرفته با استفاده از آنتی بیوتیک های قوی موضعی و برداشتن زخم های ناشی از سوختگی به نحو چشمگیری از میزان ابتلا به آن کاسته شده است (۴۲). بالای ۷ درصد از انسان ها در گلو، موکوس نازوفارنکس و یا روی پوست خود و در ۲۴ درصد افراد در مدفوع خود سودوموناس آئروژینوزا دارند (۴۳).

۱-۴-۱۱-۱-باکتری می

پس از اشرشیا کولی^{۲۶} و استافیلوکوکوس اورئوس^{۲۷}، سودوموناس آئروژینوزا سومین (و گاه چهارمین) عامل ایجادکننده باکتری می اکتسابی بیمارستانی می باشد. این بیماران از سپسیس گرم منفی مشخصی رنج می برند که با تب، تاکی پنه، دیسترس تنفسی و کاهش فشار خون همراه است. باکتری می ممکن است با ضایعات اریتماتوز پوستی همراه باشد که به آن اکتیما گانگروزوم می گویند (۳۴).

۱-۴-۱۱-۲-عفونت استخوان و مفاصل

افرادی که در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به عفونت های سودوموناسی استخوان ها و مفاصل می باشند عبارتند از استفاده کنندگان از داروهای داخل عروقی، بیمارانی که عفونت های لگنی یا دستگاه ادراری دارند. و همچنین مبتلایان به سلولیت و افراد دارای زخم های نافذ هستند (۳۴).

۱-۴-۱۱-۳-عفونت سیستم عصبی مرکزی

سودوموناس آئروژینوزا در بیمارانی که نقایص ایمونولوژیکی پیشین و یا سابقه ضربه به ناحیه سر را دارند، مننژیت و آبسه های مغزی ایجاد می کند (۳۴).

^{۲۶} *Escherichia coli*

^{۲۷} *Staphylococcus aureus*

۱-۴-۱۱-۴- عفونت گوش

باکتری می‌تواند اوتیت خارجی ایجاد کند که به نسبت خوش‌خیم است اما عفونت بسیار دردناکی است که به نام گوش شناگران نیز نامیده می‌شود. بیماران دیابتی مسن و نوزادان ممکن است به یک عفونت بسیار خطرناک که اوتیت بدخیم گوش خارجی نامیده می‌شود دچار شوند. *سودوموناس آئروژینوزا* ممکن است در نوزادان اوتیت میانی ایجاد کرده و متداول‌ترین عامل ایجادکننده اوتیت چرکی مزمن در بچه‌ها و بالغین است (۳۴).

۱-۴-۱۱-۵- عفونت چشم

سودوموناس آئروژینوزا موجب ایجاد یک زخم شدید در قرنیه می‌شود که به آن کراتیت^{۲۸} می‌گویند. ریسک فاکتورهای این عفونت شامل آسیب ملتحمه به وسیله هرپس سیمپلکس^{۲۹}، ضربه یا استفاده از لنزهای تماسی نرم می‌باشد (۳۴).

۱-۴-۱۱-۶- عفونت دستگاه گوارش

عفونت‌های *سودوموناس* دستگاه گوارش، اصولاً در نوزادان تازه متولد شده و بیماران دچار سرکوب سیستم ایمنی رخ می‌دهد. بیماران نوتروپنیک دارای انتروکولیت، همانند ضایعات اکتیما گانگروزوم در پوست، یک سری ضایعات التهابی حاوی ارگانیسم، در مخاط روده نشان می‌دهند. همچنین تب شانگ‌های که یک بیماری کودکان مشابه تب تیفوئید است، توسط *سودوموناس آئروژینوزا* ایجاد می‌شود (۳۴).

۱-۴-۱۱-۷- اندوکاردیت عفونی

سودوموناس آئروژینوزا مسئول نزدیک به دو سوم همه اندوکاردیت‌های عفونی در معتادین می‌باشد. اعتقاد بر این است که باکتری در خود دارو وجود ندارد. بلکه در آب یا وسایل مورد استفاده برای تهیه مواد مخدر موجود است (۳۴).

^{۲۸} Keratitis

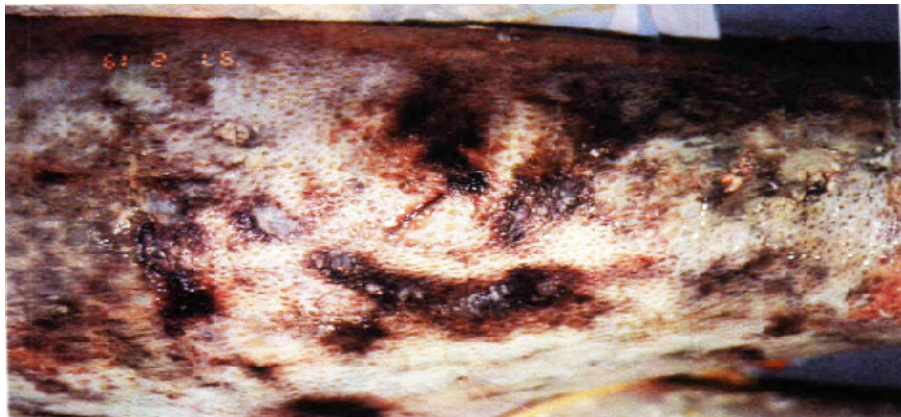
^{۲۹} Herpes simplex

۱-۴-۱۱-۸- عفونت‌های دستگاه تنفسی

پنومونی اولیه بدون حضور باکتری می معمولاً هنگامی کسب می‌شود که مبتلایان به بیماری مزمن ریوی یا آسیب احتقانی قلب، از وسایل تنفس دهنده یا بخارساز آلوده برای دریافت مواد مخدر استفاده کنند. اما پنومونی باکتری میک اولیه بیشتر در بیماران مبتلا به سرطان و نوتروپنی دیده می‌شود. در این بیماران ضایعات نکروتیک در ریه‌ها ایجاد می‌شود که مشابه ضایعات پوستی اکتیما گانگروزوم می‌باشد. عفونت‌های ریوی مزمن در بیماران مسن مبتلا به سیستیک فیبروزیس روی می‌دهد (۳۴).

۱-۴-۱۱-۹- عفونت‌های پوست و بافت نرم

استافیلوکوکوس‌ها زمانی مهم‌ترین عامل ایجاد مرگ در بیماران دچار سوختگی‌های شدید بودند. اما تنها عفونت‌های سودوموناسی هستند که می‌توانند نکروز بافتی و سپسیس^{۳۰} ایجاد کرده و به سرعت موجب مرگ بیمار شوند. سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند در بیمارانی که از وان‌های گرم آلوده با ارگانیسم، استفاده می‌کنند، درماتیت وان گرم ایجاد نماید. سندرم ناخن سبز نیز، فرمی از عفونت ایجاد شده به وسیله این ارگانیسم است (۳۴).



تصویر ۱-۱- عفونت زخم سوختگی سودوموناس

^{۳۰} Sepsis

۱-۴-۱۱-۱۰- عفونت‌های دستگاه ادراری

اشرشیا کولی، گونه‌های انتروکوکوس^{۳۱} و سودوموناس آئروژینوزا سه عامل معمول عفونت‌های دستگاه ادراری اکتسابی از بیمارستان هستند. افرادی که به صورت شایعی آلوده می‌شوند، افرادی هستند که دارای کاتترهای ادراری، التهاب مزمن پروستات و یا سنگ‌های کلیوی می‌باشند. این باکتری همانند سایر ارگانسیم‌های گرم منفی مسئول برخی از موارد پیلونفریت اکتسابی در جامعه زنان می‌باشد (۳۴).

۱-۴-۱۲- تشخیص آزمایشگاهی

۱-۴-۱۲-۱- نمونه‌ها

با توجه به نوع عفونت، نمونه را باید از ضایعات پوستی، چرک، ادرار، خون، مایع نخاعی، خلط و مواد دیگر تهیه نمود (۱).

۱-۴-۱۲-۲- گستره‌ها

در گستره‌ها، اغلب باسیل‌های گرم منفی دیده می‌شود. خصوصیات ظاهری اختصاصی که با آن بتوان سودوموناس‌ها را از سایر باسیل‌های گرم منفی افتراق داد، وجود ندارد (۳۴).

۱-۴-۱۲-۳- کشت

این باکتری‌ها بر روی بیشتر محیط‌های عادی آزمایشگاه مانند نوترینت آگار، آگار خوندار، مک کانکی، مولر هیتون و تایوگلیولات رشد می‌کند. نمونه‌ها بر آگار خونی و محیط‌های کشت افتراقی که برای رشد باسیل‌های گرم منفی روده‌ای استفاده می‌شوند، قرار داده می‌شوند. سودوموناس‌ها در بیشتر این محیط‌ها، به خوبی رشد می‌کنند، اما ممکن است رشد آن‌ها از باکتری‌های روده‌ای، آهسته‌تر باشد. سودوموناس بر اساس مثبت بودن آزمون اکسیداز و داشتن متابولیسم تنفسی از بقیه ارگانسیم‌های روده‌ای متفاوت است (۴۴). این باکتری نسبت به ترکیبات دارای آمونیوم^{۳۲} ظرفیتی مثل تترا دسیل متیل آمونیوم بروماید^{۳۲} (سیتريماید) و

^{۳۱} *Enterococcus spp*

^{۳۲} Tetra decyl methyl amonium bromide

بنزالکونیوم کلراید^{۳۳} مقاوم است. لذا از محیط سیتريمايد آگار برای تشخیص اختصاصی ایزوله‌های این باکتری استفاده می‌شود (۳۴). سودوموناس آئروژینوزا لاکتوز را تخمیر نمی‌کند و به سهولت از باکتری‌های تخمیرکننده‌ی لاکتوز، افتراق داده می‌شود. کشت، آزمایش اختصاصی برای تشخیص عفونت این باکتری است (۶).

۱-۴-۱۲-۴-جداسازی سویه های سودوموناس آئروژینوزا

برای جداسازی این باکتری از سایر باکتری‌ها، از روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی استفاده می‌گردد. سودوموناس آئروژینوزا بین ۱۸ تا ۲۰ سروتایپ دارد که سروتایپ‌ها معمولاً بر اساس آنتی ژن اختصاصی O تعیین می‌گردد، البته در حدود ۷۰ درصد سویه‌های این باکتری در بیماران سیستمیک فیبروزیس به ویژه سویه‌های موکوئیدی غیر قابل سروتایپ کردن است (۴۵). امروزه از روش‌های مولکولی جهت شناسایی سودوموناس آئروژینوزا استفاده می‌شود. تست‌های بیوشیمیایی و سایر روش‌های تشخیصی فنوتیپی ممکن است باعث تشخیص نادرست این باکتری گردد که این امر در مورد بیماران سیستمیک فیبروزیس یک مانع جهت درمان دارویی و کنترل عفونت است. سکانس کردن منطقه حفاظت شده 16sRNA به وسیله PCR، RFLP به عنوان یک استاندارد طلایی (Gold Standard) در شناسایی گونه‌های سودوموناس در نمونه‌های محیطی و بالینی استفاده می‌شود (۴۶).

۱-۴-۱۲-۵-اهمیت روش‌های مولکولی

روش‌های مولکولی به دلیل دارا بودن سرعت بالا، جایگاه ویژه‌ای در تکنیک‌های تشخیصی نوین دارند کاربرد این روش‌ها در تشخیص بیماری‌های مختلف از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و در بعضی از مراکز آزمایشگاهی بعنوان روش‌های تشخیصی تکمیلی در کنار سایر آزمایش‌های روتین مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۷). روش‌های مرسوم تشخیص میکروبی صرفاً بر ویژگی‌های فنوتیپی ارگانیزم تکیه می‌کنند. اگر چه برخی از ویژگی‌های فنوتیپی مانند پروفایل ایزوآنزیم، حساسیت آنتی بیوتیکی و تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی اسیدهای چرب سلولی، دارای ویژگی کافی برای تشخیص سویه میکروبی هستند، اما با این وجود اغلب ویژگی‌های فنوتیپی مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی، حساسیت کافی برای تشخیص سویه را ندارند (۴۷ و ۴۸).

^{۳۳} Benzalkonium chloride

از زمانیکه روش‌هایی برای تجزیه و تحلیل ژنوم میکروبی در دسترس قرار گرفتند، فصل جدیدی در شناسایی خصوصیات میکروبی آغاز گردید. با وجود اینکه اسید دزوکسی ریبونوکلیئیک در اواخر دهه ۱۸۶۰ کشف گردید، ولی تا شناسایی آنزیم‌های محدود الاثر و تکنیک‌های DNA نو ترکیب در دهه ۱۹۷۰ مورد استفاده قرار نگرفت. در طول این زمان، بسیاری از دانشمندان در حال تلاش برای کشف رمز و راز نهفته در DNA بودند. در طول چند سال گذشته، توسعه و استفاده از روش‌های تشخیصی مولکولی، انقلابی در تشخیص و کنترل بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است. سیستم‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص عوامل بیماری به طور مستقیم از نمونه‌های بالینی و بدون نیاز به کشت، در تشخیص سریع میکروارگانیزم غیر قابل کشت و یا سخت رشد حائز اهمیت می‌باشند. علاوه بر این تجزیه و تحلیل تکثیر توالی DNA میکروبی، شناسایی و توصیف بهتر پاتوژن میسر می‌سازد. با توجه به پیشرفت‌های قابل توجه در روش‌های تشخیص مولکولی در سالیان اخیر و همچنین کاهش خطر آلودگی، کاهش هزینه‌ها، و سریع‌تر بودن این روش‌ها نسبت به روش‌های مرسوم، روش‌های مولکولی پتانسیل جایگزینی روش‌های تشخیصی مرسوم در میکروب شناسی را دارند. امروزه روش‌های مولکولی فصل جدیدی در میکروب شناسی باز نموده اند که تحت عنوان میکروب شناسی مولکولی به تشخیص عوامل بیماریزا، مکانیسم‌های بیماریزایی و غیره می‌پردازند (۴۷ و ۴۸).

۱-۴-۱۲-۶- بکارگیری PCR

اولین بار واکنش PCR توسط Mullis در سال ۱۹۸۴ توصیف شد. این واکنش بهترین روش، جهت تکثیر قطعه‌ای از DNA ژنوم به تعداد میلیون‌ها کپی در طی مدت زمان کوتاه می‌باشد. از این تکنیک در مهندسی ژنتیک، بیولوژی مولکولی، تشخیص سرطان‌های مختلف، تشخیص هویت، جرم شناسی، تعیین ترادف، باستان‌شناسی و غیره استفاده می‌شود (۴۹). واکنش PCR شامل سه مرحله می‌باشد که در طی آن ابتدا DNA دو رشته‌ای هدف واسرشته می‌شود^{۳۴}. سپس پرایمرها به مکمل خود روی DNA تک رشته‌ای اتصال می‌یابند^{۳۵}. آنگاه در طی یک واکنش آنزیمی پلیمریزاسیون توسط آنزیم Taq پلیمراز، رشته جدید بطور کامل سنتز می‌شود^{۳۶}. با تکرار این مراحل (۴۰-۲۵ سیکل) در نهایت میلیون‌ها کپی از سکانس DNA هدف سنتز می‌شود. هر یک از

^{۳۴} Denaturation

^{۳۵} Annealing

^{۳۶} Extension

مراحل PCR در دمای ویژه‌ای انجام می‌شود. معمولاً مرحله Denaturation در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مرحله Extension در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه برای فعالیت آنزیم Taq پلیمراز) انجام می‌شود. دمای مرحله اتصال پرایمرها (Annealing) به قطعه مکمل خود در DNA تک رشته ای، به سکانس آنها و دیگر شرایط واکنش بستگی دارد (۴۹).

پرایمرها قطعات کوتاهی از DNA به طول ۱۸-۳۰ نوکلئوتید هستند که مکمل بخش‌هایی از DNA هدف می‌باشند. پس از جدا شدن دو رشته DNA در حرارت بالا، پرایمرها با کاهش دما به سکانس‌های مکمل خود متصل می‌شوند. پرایمرها به عنوان جایگاه شناسایی آنزیم پلیمراز جهت همانندسازی هستند. آنزیم Taq پلیمراز نوکلئوتیدهای بعدی مکمل DNA هدف را با استفاده از داکسی ریبونوکلئوتیدها (dNTPs) می‌سازد و بدین ترتیب رشته DNA مکمل قطعه هدف سنتز می‌شود. اصول واکنش PCR در واقع از تکثیر DNA در داخل سلول زنده اقتباس شده است (۴۹ و ۵۰).

۱-۴-۱۲-۷-بکارگیری Repetitive sequencing-based PCR (REP-PCR)

مجموعه ای از توالی های تکراری DNA در رونوشت‌های متعدد در ژنوم باکتریها پراکنده هستند. اگرچه عملکرد این توالی تکراری ناشناخته است ولی حضورشان برای انگشت نگاری DNA مفید است (۵۱) در REP-PCR، پرایمرهایی که مکمل توالی تکراری اند باعث قطعات DNA بین عناصر تکراری می شوند (۵۲ و ۵۳). سه خانواده از توالی های تکراری شامل توالی پالیندرومی تکراری خارج ژنی (۳۵-۴۰bp) (REP)، توالی داخلی ژنی تکراری انتروباکتریال (۱۲۷-۱۲۴bp) و توالی (۱۵۴BOXbp) در آزمایش REP-PCR استفاده می شوند (۵۴ و ۵۱). بهینه سازی شرایط الکتروفورز مانند ولتاژ به طور موثر امکان جداسازی قطعات DNA تکثیر یافته بیش از ۱۰۰۰ bp را افزایش می دهند. با توجه به هزینه پایین مواد، سرعت و تکنیک آسان، REP-PCR می تواند یک روش با ارزش برای تایپینگ سویه های باکتری باشد (۵۱). بر خلاف Arbitrarily primed PCR (AP-PCR)، این روش تکرارپذیری بیشتری دارد زیرا از پرایمرهای مخصوص جهت تکثیر استفاده می شود. نقص های این سیستم مشابه دیگر روش های PCR مانند آلودگی، آرتی فکت است و نیاز به کنترل های متعدد دارد (۵۱ و ۵۵).

۱-۴-۱۲-۸-آزمایش‌های ژنتیکی و سرولوژیک

PCR و واکنش آنتی بادی‌های اختصاصی با آنتی ژن‌های سطح باکتری از این دسته آزمایش‌ها می‌باشد.

۱-۴-۱۲-۹-سایر روش‌های تشخیصی

سودوموناس آئروژینوزا در دمای ۲۷ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد، به خوبی رشد می‌کند. رشد آن در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، به افتراقش از سایر گونه‌های فلوئورسنت سودوموناس، کمک می‌نماید (۷).

۱-۴-۱۳-حساسیت نسبت به عوامل مختلف

۱-۴-۱۳-۱-حساسیت نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی

سودوموناس آئروژینوزا مقاومت خاصی در برابر گرما نداشته، در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت از بین می‌رود، این باکتری ماهها در حرارت محیط قادر به ادامه حیات در آب می‌باشد اما در اثر خشک شدن پس از نیم ساعت ۹۹٪ باکتری‌ها می‌میرند. سودوموناس آئروژینوزا نسبت به بسیاری از مواد شیمیایی مقاومت نشان می‌دهد. این باکتری در بسیاری از محلول‌های چشمی به راحتی یافت می‌شود. لذا توصیه شده است در این محلول‌ها از فیل اتانول همراه با یک محلول ضد عفونی کننده وسیع الطیف مانند بنزوالکونیم کلراید و یا کلروهگزیدین، کلروکروزول و برخی ترکیبات مرکب مؤثر نظیر EDTA^{۳۷} - بنزوالکونیم و EDTA - کلروکروزول استفاده شود. گونه‌های این باکتری از مقاومت نسبی در برابر ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیوم، به خصوص ستریماید، دتول و بنزوالکونیم کلراید برخوردار هستند به ویژه در محلول قلیایی ۲٪ گلو تار آلدئید، ماده ای مؤثر علیه این باکتری است. این ارگانسیم حساس به اسید و نمک‌های نقره است. از حساسیت نسبت به نقره جهت درمان عفونت‌های ناشی از سوختگی استفاده شده، با این حال سویه‌های مقاوم به نقره نیز گزارش شده است (۲۹).

^{۳۷}Ethylenediaminetetraacetic acid

۱-۴-۱۳-۲- حساسیت در برابر آنتی بیوتیک

سودوموناس آئروژینوزا دارای یک مقاومت ذاتی نسبت به آنتی بیوتیک ها می باشد. آنتی بیوتیک ها با فعالیت بیش از ۷۵٪ علیه سودوموناس آئروژینوزا عبارتند از: کارباپنم ها، پی پراسیلین، سفپییم، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و توبرامایسین. در بین کارباپنم ها مروپنم فعالیت بهتری نسبت به ایمی پنم علیه سودوموناس دارد. در مطالعه ای که اخیراً در آمریکا صورت گرفته بود ۱۶٪ از سویه ها به سه دارو یا بیشتر، از داروهای اصلی آمیکاسین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، ایمی پنم و پی پراسیلین مقاوم بودند و ۱٪ از گونه ها به هر ۶ دارو مقاوم بودند (۵۶). از این رو با هدف به تعویق انداختن بروز سریع مقاومت، دست یابی به اثرات هم افزایی ضد میکروبی و درمان عفونت های شدید، استفاده همزمان از آنتی بیوتیک ها با توجه به پروتکل های مؤسسات درمانی صورت می گیرد (۵۷).

۱-۴-۱۳-۳- مقاومت دارویی چند گانه در سودوموناس آئروژینوزا

سویه های سودوموناس آئروژینوزا MDR^{۳۸} به طور فزایندهای در سراسر جهان افزایش یافته است، اگر چه تعریف MDR متغیر است. اما اغلب شامل مقاومت به فلوروکینولون ها، سفالوسپورین های وسیع الطیف، کارباپنم ها و آمینوگلیکوزیدها می شود. به عنوان مثال افزایش پیش رونده ای در سویه های سودوموناس آئروژینوزا MDR، مقاومت به ۳ یا بیش از ۳ آنتی بیوتیک، از ۷/۱٪ در سال ۱۹۹۲ تا ۹/۹٪ در سال ۲۰۰۳ در آمریکا مشاهده شده است (۵۸ و ۵۹). سویه های سودوموناس آئروژینوزا MDR در برخی کشورها از جمله کشورهای آسیایی، آمریکای جنوبی، جنوب اروپا و کشورهایی که در مرز دریایی مدیترانه قرار گرفته اند، به تعداد زیاد یافت می شود. سویه های MDR از این جهت نگران کننده اند که با افزوده شدن مکانیزم های خاص مقاومت به دلیل کسب ساختارهای ژنتیکی مقاومت مانند ترانسپوزون، اینتگرون و پلاسمید، برگشتشان اگر غیر ممکن نباشد بسیار مشکل است (۶۰).

^{۳۸}Multidrug-resistant

گزارش های اخیر مکانیزم های موفق مقاومت، مانند پمپ انتشار به خارج، فقدان نفوذ پذیری غشای خارجی و تولید آنزیم های مختلف را که بر اساس ایجاد MDR در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا می باشند، را روشن نموده اند. برای مثال به تازگی گزارش شده که پدید آمدن مکانیزم های مقاومت به بتالاکتام ها در اثر انتشار ESBL ها و متالو - کارباپنمازها می باشد. تهدید مهم دیگر، انتشار کارباپنمازهای متعلق به گروه متالو-بتا-لاکتامازها می باشد که انواع متعددی بوده (خانواده های IMP,VIM,SPM,GIM) و در تمامی کشور ها جدا شده اند از جمله این موارد در ژاپن، آسیا، آمریکای جنوبی، یونان، کانادا و ایتالیا پراکندگی زیادی دارند. اغلب ژن های متالو-بتا-لاکتاماز همراه با ترانسپوزون ها، اینتگرون ها و یا پلاسمیدهایی می باشند که آن ها را ناقلین عالی برای یکی کردن ژن های مقاومتی که از نظر ساختاری با هم یکی نیستند می سازد(۵۸). ممکن است مشکل شناسایی سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده ESBL و متالو-بتا-لاکتامازها در میکروبیولوژی بالینی منجر به افزایش انتشار آن ها شود. بیان ESBL و متالو-بتا-لاکتامازها در ایزوله های منفرد نیز گزارش شده است(۵۹). بنابراین مقاومت دارویی تام در عفونت های سودوموناس آئروژینوزای کسب شده در ICU، در سراسر دنیا باید به طور فزاینده ای مشاهده شده باشد. اغلب تعیین کننده های مقاومت به بتالاکتامها با مقاومت به بیشتر آمینو گلیکوزیدها یکی است. اخیراً انتشار ژن های مقاومت آمینو گلیکوزیدهای جدید از ژاپن گزارش شده است(۶۱ و ۶۲). علاوه بر این آنزیم های تغییر دهنده آمینو گلیکوزیدی دو عملکردی نیز در این باکتری گزارش شده است(۶۳).

۱-۴-۱۴-آنتی بیوتیک های بتالاکتام

بتالاکتامها داروهای مناسبی جهت درمان عفونت های باکتریایی هستند که در سراسر جهان مورد استفاده قرار می گیرند. خصوصیت مشترک تمام بتالاکتامها، داشتن حلقه مرکزی چهار ضلعی بتالاکتام و جلوگیری از تشکیل دیواره سلولی، به عنوان مکانیسم اولیه عملکرد است. وجود حلقه های اضافی یا جایگزین که به حلقه بتالاکتام

اضافه می‌شوند، شاخص قرار گرفتن داروی مربوطه در یکی از زیرگروه‌های پنی‌سیلین^{۳۹}، سفم^{۴۰}، کارباپنم^{۴۱} یا منوباکتام^{۴۲} است (۶۴).

مکانیسم اصلی مقاومت باسیل‌های گرم منفی به عوامل ضد میکروبی بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. بتالاکتامازها پروتئین‌های گلوبولاری هستند که دارای ۱۱ هلیکس آلفا و ۵ صفحه بتا می‌باشند و تاکنون ساختمان سه بعدی تعدادی از آن‌ها تعیین شده است. این آنزیم‌ها پیوند آمیدی حلقه بتالاکتام را شکسته و آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را برای باکتری بی اثر می‌کنند، در نتیجه درمان آنتی‌بیوتیکی را با شکست مواجه می‌کنند (۶۵).

همه سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* یک بتالاکتاماز از نوع AmpC با واسطه کروموزوم تولید می‌کنند ولی تعداد نسبتاً زیادی بتالاکتاماز با واسطه پلاسمید تولید می‌کنند. آنزیم AmpC کروموزومی در حالت عادی سرکوب شده است ولی قویاً به وسیله سفالوسپورین‌های نسل اول القاء می‌شود. آن‌ها فاقد فعالیت ضد *سودوموناس آئروژینوزا* هستند. یوریدو پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم نیز در مقابل آنزیم AmpC ناپایدار هستند ولی سنتز آن را القاء نمی‌کنند. بنابراین آن‌ها تا وقتی که آنزیم القا نشده باشد فعال باقی می‌مانند ولی موتانت‌های سرکوب شده مثل آن‌هایی که AmpC را به مقدار زیاد می‌سازند به طور خودبخودی با فرکانس متوسط ایجاد می‌شوند (۶۶ و ۶۷) و می‌توان آن‌ها را به صورت *In vivo* در طی درمان سفالوسپورین و یوریدو پنی‌سیلین‌ها انتخاب کرد. این موتان‌ها به همه بتالاکتام‌ها به جز ایمپنم و گاهی اوقات کربنی سیلین و تموسیلین مقاوم هستند. انتخاب موتان‌های سرکوب شده با *سودوموناس آئروژینوزا* به جز در وضعیت‌های مزمنی مثل عفونت تنفسی در بیماران سیستمیک فیبروزیس نادر است. تعداد زیادی بتالاکتامازهای با واسطه پلاسمید یا ترانسپوزون در *سودوموناس آئروژینوزا* گزارش شده است، ولی بروزشان کمتر از انتروباکتریاسه هاست.

در ۱۰ سال گذشته چندین گروه بتالاکتاماز با طیف اثر وسیع در باکتری کشف شده است. این آنزیم‌ها به گروه‌های A (پنی‌سیلینازها، متالو آنزیم‌ها) گروه B (اگزا سیلینازها) و یا گروه D تعلق دارند. تاکنون در

^{۳۶} Penicillin

^{۳۷} Cephem

^{۳۸} Carbapenem

^{۳۹} Monobactam

این گونه باکتری چند آنزیم متعلق به گروه A شناسایی شده است که مهم ترین آن ها عبارتند از TEM-1، PER-1 و SHV2a. این آنزیم ها عامل مقاوم به یوریدو پنی سیلین، سفنازیدیم، سفپیرم و سفپیم هستند. تمام آنزیم ها در In Vitro به کلاولانیک اسید و سولباکتام حساس اند. PER-1 برای نخستین بار از یک ایزوله سودوموناس آئروژینوزا عامل عفونت اداری یک بیمار ترک بستری در پاریس در سال ۱۹۹۲ شناسایی شد. در یک مطالعه مشخص شد که ۱۱ درصد سویه های جدا شده در ترکیه دارای این آنزیم بودند که البته هیچ یک از ایزوله ها پلاسمید نداشتند. در یک اپیدمی در سال ۱۹۹۹ در ایتالیا ۱۰۸ سویه سودوموناس آئروژینوزا دارای این آنزیم بودند.

TEM-42 دومین آنزیم گروه A است. این آنزیم برای نخستین بار در سال ۱۹۹۲ در پاریس شناسایی شد و به نظر می رسد که تنها محدود به یک منطقه باشد. این آنزیم سفنازیدیم و آزترونام را به شدت هیدرولیز می کند. TEM-42 پلاسمیدی و کونژوگاتیو است. همچنین در فرانسه نیز یک سویه سودوموناس آئروژینوزا دارای بتالاکتاماز TEM-2 شناسایی شد. PH این آنزیم ۵/۶ بوده و آنزیم به کلاولونات سولباکتام و تازوباکتام حساس می باشد.

SHV-2a نیز در سویه های باکتری در سال های ۱۹۹۵ و ۱۹۹۶ در پاریس شناسایی شد. این آنزیم وابسته به پلاسمید است و بیان شدن آن می تواند به دلیل نفوذ سکانس نفوذی IS Δ /5 در قسمت جلوی ژن ساختمانی بتالاکتاماز باشد.

گروه دوم بتالاکتامازها با طیف اثر وسیع موجود در سودوموناس آئروژینوزا IMP-1 بوده و به گروه B آنزیم ها تعلق دارند. این آنزیم ها بیشتر بتالاکتام ها از جمله سفنازیدیم، سفپیم و سفپیروم (اما نه آزترونام) را هیدرولیز می کنند. از آنجایی که این آنزیم ها، ایمی پنم و مروپنم را هیدرولیز می کنند. نام کرباپنماز را نیز برای آن دسته مناسب دانسته اند، مانند تمام آنزیم های گروه B، IMP-1، نیز به کلاولانیک اسید و سولباکتام مقاوم است. همچنین در ژاپن نیز ژن IMP-1 که کد کننده کرباپنماز و عوامل مقاومت به ایمی پنم است شناسایی شده است همانند تمام آنزیم های گروه B، IMP-1 نیز به کلاولانیک اسید و سولباکتام مقاوم است. IMP-1 نخستین بار در سودوموناس آئروژینوزا به فرم وابسته به پلاسمید شناخته شد اما پس از مدتی شکل ایتگرونی آن نیز کشف شد. این کشف می تواند دلیل شیوع آنزیم در برخی جنس های متعلق به انتروباکتریاسه را شرح دهد. به نظر می رسد IMP-1 تنها محدود به ژاپن باشد.

گروه سوم بتالاکتامازهای با طیف اثر وسیع در این باکتری به گروه D تعلق دارند. این گروه بتالاکتاماز کمی به کلاولانیک اسید حساس اند (به غیر از OXA-8). در این گروه از بین آنزیم‌های مشتق شده از OXA-10 و OXA-19 و OXA-14 و OXA-16 در باکتری وجود دارند. OXA-18 دارای ویژگی شبیه به کلاس A در ESBL (Extended spectrum Beta Lactamases) هاست. این آنزیم سفتازیدیم و آزترونام را هیدرولیز کرده و کاملاً به اسید کلاولانیک حساس است. تمام این آنزیم‌ها به غیر از OXA-18 پلاسمیدی اند. این آنزیم‌ها در سال ۱۹۹۲-۱۹۹۱ در ترکیه و تنها OXA-18 در سال ۱۹۹۵ در فرانسه شناسایی شدند (۶۸).

۱-۴-۱- طبقه‌بندی بتالاکتامازها

با پیدایش آنزیم‌های بتالاکتاماز در میان باکتری‌ها پدیده مقاومت در بسیاری از آنها، بخصوص باکتری‌های ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در حال افزایش است. در نتیجه درمان عفونت‌های ناشی از آنها را با مشکلات جدی روبرو ساخته است. بتالاکتامازها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Bush-Jacoby-Medeiros) طبقه‌بندی می‌شوند. طبقه‌بندی مولکولی توسط Ambler در سال ۱۹۸۰، هنگامی که فقط سکانس چهار اسید آمینه از بتالاکتامازها شناسایی شده بود، صورت گرفت. بتالاکتامازها براساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی A تا D تقسیم می‌شوند.

کلاس A: باعث هیدرولیز پنی سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌شود.

کلاس B: متالوبتالاکتامازهای وابسته به روی (zn) می‌باشد که قادر به هیدرولیز کارباپنم‌ها بوده و در باکتری‌هایی مانند سریشیا مارسسنس و سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده‌اند. کلاس B بر اساس تفاوت آمینواسیدی که در جایگاه فعال این آنزیم‌ها وجود دارد به ۳ زیر کلاس B1، B2، B3 تقسیم می‌شود

کلاس C: که از آنها می‌توان به Ampc بتالاکتامازها اشاره نمود که توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها و سفومايسين‌ها را دارند .

کلاس D: بتالاکتامازهایی با قدرت هیدرولیز فراوان مثل OXA^{۴۳} بر علیه کلوکسازین‌ها و اکساسیلین‌ها هستند. در طبقه‌بندی Bush، که در سال ۱۹۹۵ ارائه شد بتالاکتامازها براساس پروفایل سوبسترای و پروفایل مهارکنندگی به سه گروه و چندین زیر گروه تقسیم می‌شوند:

گروه ۱: سفالوسپورینازهایی هستند که توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مانند کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند.

^{۴۰}Oxacillinase

گروه ۲: پنی سیلینازها یا سفالوسپورینازها یا هر دو را شامل می‌شود. توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مهار می‌شوند. بر اساس سوبسترای خود به ۸ زیرگروه 2a، 2b، 2br 2be، 2c، 2d، 2e، 2 f تقسیم می‌شوند.

گروه ۳: شامل متالوبتالاکتامازهایی هستند که در سایت فعال آنها فلز روی وجود دارد که برای تخریب حلقه بتالاکتام مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم‌ها طیف سوبسترائی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز منوباکتام (آزترئونام) هستند. این آنزیم‌ها داخل اینتگرون قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمیدها یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سایر سویه‌های سودوموناس و باکتری‌های دیگر از جمله انتروباکتریاسه‌ها را دارند. متالوبتالاکتامازها توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مهار نمی‌شوند. بلکه توسط شلاته کننده‌های فلزی از قبیل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) و گروه تیول مهار می‌شوند (۶۹ و ۷۰).

۱-۴-۱۵- مقاومت آنتی بیوتیکی

مقاومت آنتی بیوتیکی به بروز یک ویژگی خاص در یک میکروارگانیسم گفته می‌شود که باعث می‌شود تحت تاثیر داروهای آنتی میکروبی قرار نگیرد. آن هم درحالی‌که قبلاً نسبت به داروی مذکور حساس بوده است و به این ترتیب آن دارو دیگر موجب مرگ یا توقف رشد آن میکروارگانیسم نخواهد شد. مصرف بی‌رویه یا نداشتن الگوی مصرف درست آنتی بیوتیکی یکی از چالش‌های اساسی در بروز مقاومت‌های باکتریایی تلقی می‌شود (۷۱).

در بروز مقاومت دارویی فاکتورهای متنوعی دخیل است که شامل نوع باکتری عفونت‌زا، محل عفونت در داخل بدن، توزیع آنتی بیوتیک در بدن، غلظت دارو و وضعیت ایمنی بیمار می‌باشد. در تلاش انسان برای کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی بایستی به دو فاکتور مهم استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها و سهولت در گسترش ژن‌های مقاومت دارویی توجه نمود. به طوری که روز به روز بر تعداد باکتری‌های مقاوم افزوده می‌شود و این امر موجب نگرانی میکروبیولوژیست‌ها، پزشکان و متخصصان صنایع دارویی شده است (۷۲).

۱-۴-۱۵-۱- چگونگی ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی

به طور کلی چهار مکانیسم عمده برای ایجاد مقاومت وجود دارد که عبارتند از (۷۳):

۱- نفوذپذیری پایین سل وال (مقاومت ذاتی)

۲- تولید بتالاکتامازها، آمینوگلیکوزیدازها و سفالوسپورینازهای خارج سلولی کروموزومی یا پلاسمیدی

۳- تغییر در جایگاه‌های پروتئینی اتصال به آنتی‌بیوتیک

۴- مکانیسم افلاکس فعال که آنتی‌بیوتیک را به خارج پمپ می‌کند.

اصلی‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا کاهش تراکم درون سلولی از طریق افلاکس پمپ^{۴۱}ها، تولید بتالاکتامازهای خارج سلولی با منشاء پلاسمیدی و کروموزومی، آنزیم‌های تغییردهنده ساختمان شیمیایی آمینوگلیکوزیدها و کاهش نفوذپذیری غشاء باکتری در کانال‌های پورین ریز می‌باشد. دو مسیر عمده عبور آنتی‌بیوتیک‌ها از میان غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا، انتقال یون‌های منیزیم موجود در پل‌های عرضی لیپوپلی‌ساکارید باکتری و تخریب آن و مسیر دوم عبور از میان پورین‌های غیراختصاصی می‌باشد به گونه‌ای که تشکیل کانال‌های پر از آبی را در غشاء می‌دهد و به صورت یک غربال مولکولی از عبور مولکول‌های بزرگ‌تر از ۹ کیلودالتون جلوگیری می‌کند (۷۴ و ۷۵ و ۷۶).

۱-۴-۱۶-منشاء مقاومت دارویی

۱-۴-۱۶-۱-منشاء ژنتیکی

۱-۴-۱۶-۲-مقاومت کروموزومی

این مقاومت در نتیجه جهش خود به خودی در ژن‌های کنترل کننده باکتری به داروهای ضد میکروبی رخ می‌دهد. جهش‌های کروموزومی بیش از همه بر اثر تغییر در ساختمان گیرنده‌ی یک دارو مقاوم می‌شوند. ناحیه‌ی کوچکی از کروموزوم باکتری ژن‌های ساختمانی اغلب گیرنده‌های دارویی از جمله آمینوگلیکوزیدها را کد می‌کند. گاهی بر اثر جهش، PBP ها از بین می‌رود و یا تغییر شکل می‌دهد به طوری که داروهای بتالاکتام قادر به اتصال نیستند، در نتیجه جهش‌های مقاوم نسبت به داروهای بتالاکتام به وجود می‌آید. در جهش خود به خودی، افلاکس پمپ‌ها آنتی‌بیوتیک‌ها را دفع می‌کند. کلنی باکتری‌ها با آنتی‌بیوتیک تخریب می‌شود و باکتری‌های باقی‌مانده جهش یافته و امکان مقاومت دارویی وجود دارد؛ باکتری‌های مقاوم، کلنی‌های مقاوم چندگانه ایجاد می‌کنند. جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های توپوایزومراز و جهش‌های تنظیمی که قادر به افزایش بیان ژن‌های ذاتی و اپرون‌ها هستند در برخی شرایط منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شوند (۷۷ و ۷۸).

^{۴۱} Efflux pump

۱-۴-۱۶-۳- مقاومت خارج کروموزومی

مقاومت کسب شده با مبادله ی ژن ها بین سویه های باکتریایی از طریق جابه جایی قطعات DNA به عنوان پلاسمیدها حاصل می شود. این پلاسمیدها اطلاعات را از سلولی به سلول دیگر انتقال می دهند. عوامل R دسته - ای از پلاسمیدها هستند که ژن های مقاومت به یک و گاهی چند داروی ضد میکروبی را حمل می کنند. ژن های پلاسمیدی مربوط به مقاومت دارو معمولاً تولید آنزیم هایی که سبب از بین بردن اثر داروهای ضد میکروبی می - شوند را کنترل می کنند. مقاومت چند دارویی در *سودوموناس آئروژینوزا* به وسیله ی رخدادهای ژنتیکی متعددی از جمله کسب جهش های گوناگون و انتقال افقی ژن های مقاوم آنتی بیوتیکی ایجاد می شود (۷۸).

۱-۴-۱۶-۴- منشاء غیر ژنتیکی

فعالیت اغلب داروهای ضد میکروبی به تکثیر فعال باکتری ها نیاز دارد. پس میکروارگانیسم هایی که به صورت متابولیک غیر فعال هستند یعنی تکثیر نمی یابند ممکن است به صورت فنوتیپی به داروها مقاوم گردند، با این حال نسل های بعدی کاملاً حساس می باشند. یا اینکه میکروارگانیسم ممکن است در محل هایی از بدن ایجاد عفونت کنند که دارو نتواند در آنجا وارد شود. اغلب مکانیسم هایی که قبلاً برای ایجاد مقاومت بیان شد مثل کاهش غلظت داخل سلولی دارو، کاهش جذب دارو از طریق غشا سلولی و می تواند از موارد غیر ژنتیکی مقاومت باشد (۶۱).

۱-۴-۱۷- روش دیسک دیفیوژن آگار

تست غربالگری دیسک دیفیوژن باید بر روی محیط مولر هیتون آگار که توسط سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت نیم مک فارلند تلقیح شده است، صورت گیرد و پس از ۱۶ الی ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵- ۳۷ درجه سانتی گراد، قرائت شود. دیسک های آنتی بیوتیکی مورد نیاز و همچنین قطر هاله عدم رشد ارگانیسم ها در برابر هر یک از دیسک ها طبق استانداردهای CLSI صورت می گیرد. متعاقب این روش تست دیسک ترکیبی^{۴۵} انجام می گیرد (۷۹).

^{۴۲} Combined Disk

۱-۴-۱۷-۱- تست های تاییدی

تست غربالگری ESBLs: ابتدا تمامی ایزوله ها بر طبق دستورالعمل استاندارد با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن نسبت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، سفوتاکسیم، آزترونام، سفپودوکسیم و سفتریاکسون مورد غربالگری قرار می گیرند.

تست تاییدی ESBLs: ایزوله هایی دارای کاهش حساسیت نسبت به هر کدام از آنتی بیوتیک های مرحله غربالگری توسط تست تائیدی تولید ESBLs به روش دیسک ترکیبی (Combined Disk Method) مورد بررسی قرار می گیرند. در این آزمون از دیسکهای سفنازیدیم و سفنازیدیم / کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم و سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید استفاده می شود. نتایج طبق دستورالعمل CLSI تفسیر می گردد بدین صورت که افزایش قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی معادل $5 \text{ mm} \geq$ در مقایسه با قطر هاله عدم رشد دیسک به تنهایی باشد از نظر ESBLs مثبت در نظر می گیریم.

در آزمون های فنوتیپی از *E.coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و از *E.coli* ATCC 35218 و *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت استفاده می شود (۸۰).

۱-۴-۱۸- سایر آنتی بیوتیک ها

تقریباً همه سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها را بیان می کنند ولی انواع با واسطه پلاسمید نسبتاً کمیاب است. آنزیم ها با استیلایسیون، فسفریلاسیون یا آدنیلایسیون آمینوگلیکوزیدها را تغییر می دهند. نهایتاً همه سویه ها دارای ۶ فسفوترانسفراز و ۳ فسفوترانسفراز هستند که نئومایسین و کانامایسین را تغییر می دهند. ۳ استیل ترانسفراز و ۲ آدنیل ترانسفراز هر دو جنتامایسین و توبرامایسین را تغییر می دهند و ۶- استیل ترانسفراز باعث مقاومت به آمیکاسین می گردد (۱). پیشنهاد شده که تمایل غشاء خارجی به جنتامایسین در سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* دارای لیپو پلی ساکارید B-band نسبت به A-band بالاتر است. سویه های دارای لیپو پلی ساکارید B-band به کشتن ناشی از آنتی بیوتیک ها حساس ترند. سویه های دارای هر دو شکل LPS بیشتر از سویه های فاقد یکی از دو شکل به جنتامایسین متصل می شوند. این نتایج

نشان می‌دهد که اتصال یونی آمینوگلیکوزیدها به غشای خارجی سطوح سلول سودوموناس آئروژینوزا نه تنها سطح را ضعیف می‌کند بلکه در مرگ سلولی اهمیت دارد. کینولون‌های فلورینه به ویژه سیپروفلوکساسین به شدت علیه سودوموناس فعال‌اند. با این وجود مقاومت می‌تواند در طی درمان طولانی مدت عفونت‌های مزمن ایجاد شود. همانند دیگر باکتری‌ها هنگامی که دارو قطع شود سویه‌ها به شدت دوباره حساس می‌شوند. مقاومت سطح بالا اغلب ناشی از موتاسیون در DNA ژیراز است ولی مقاومت در سطح پایین می‌تواند نتیجه نفوذناپذیری و یا تنظیم افزایشی سیستم افلاکس چند دارویی باشد. کینولون‌ها می‌توانند به وسیله پورین‌ها یا به وسیله یک مسیر جذب خود راه اندازی شده شبیه آمینوگلیکوزیدها از غشای خارجی عبور کنند. تغییرات در پروتئین‌های اصلی غشاء خارجی (MOMP) و LPS هر دو در کاهش نفوذ سیپروفلوکساسین در سودوموناس آئروژینوزا ثابت شده است (۸۱).

۱-۴-۱۹- اپیدمیولوژی

سودوموناس آئروژینوزا ارگانیسمی است که در همه جا انتشار دارد و در آب، خاک و گیاهان یافت می‌شود. این ارگانیسم بر روی پوست و در دستگاه گوارشی و حلق حدود ۳ درصد از مردم، به صورت فلور نرمال وجود دارد. اما میزان حامل بودن آن، در میان پرسنل بیمارستان ممکن است به ۲۰ درصد برسد (۱). سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند دما را تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد تحمل کند. این باکتری می‌تواند در بیشتر محیط‌ها با کمترین میزان مواد غذایی رشد کند و حتی در آب مقطر، با مصرف CO₂ حل شده در آب و باقی مانده‌های سولفور و فسفر و آهن زنده می‌ماند (۳۴). از آنجاییکه سودوموناس‌ها در محیط‌های مرطوب به خوبی رشد می‌کنند، بیشتر عفونت‌های ناشی از این باکتری به علت قرار گرفتن در معرض رطوبت است. مانند عفونت‌های پوستی این باکتری که از حمام‌ها و استخرهای شنا انتقال می‌یابد و عفونت‌های چشمی که در اثر تماس با لنزهای مرطوب است (۳۴). از این رو باید به ظرف‌شویی‌ها، گل‌ها، حمام‌ها، دوش‌ها، لوله‌های آب گرم و سایر محیط‌های مرطوب توجه مخصوص نمود. این باکتری، بیشتر عامل عفونت‌های بیمارستانی است و کنترل عفونت‌های آن شبیه سایر عوامل عفونت‌های بیمارستانی است (۱).

عفونت‌های بیمارستانی و کلونیزاسیون باکتری در بخش‌های مختلف کلینیکی معمولاً در موارد زیر مشاهده می‌شود:

۱- افرادی که از دستگاه‌های تهویه مکانیکی استفاده می‌کنند.

۲- افرادی که تحت درمان وسیع آنتی بیوتیکی هستند.

۳- افراد تحت درمان با داروهای شیمی درمانی

۴- افرادی که سابقه جراحی داشتند (۳۴).

۱-۴-۲۰-درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا

درمان عفونت‌های ایجادشده توسط سودوموناس آئروژینوزا یک مشکل پیچیده برای پزشکان به شمار می‌رود. نه تنها این باکتری‌ها به صورت ذاتی به دامنه وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم‌اند بلکه توانایی افزایش مقاومت را هنگام درمان کسب می‌کنند. این توسعه مقاومت در هنگام درمان آنتی بیوتیکی مخصوصاً در بیماری سیستمیک فیبروزیس (به عنوان یک بیماری مزمن) به علت دوره مصرف آنتی بیوتیک به مدت طولانی، مشکل ساز است. اخیراً نشان داده شده است که بسیاری از ایزوله‌های جدا شده از بیماران سیستمیک فیبروزیس دارای توانایی فوق‌العاده‌ای برای کسب مقاومت آنتی بیوتیکی در طی دوره درمان دارند (۸۲). به رغم چنین مقاومت گسترده‌ای برای درمان عفونت‌های این باکتری تعدادی آنتی بیوتیک موثر وجود دارد. مهم‌ترین خانواده‌های آنتی بیوتیک که در درمان سودوموناس آئروژینوزا موفقیت کسب کرده‌اند شامل آمینوگلیکوزیدها (از قبیل جنتامایسین و توبرامایسین)، پنی‌سیلین‌های نیمه سنتتیک (مثل کاربنی سیلین، تیکارسیلین و پیراسیلین)، سفالوسپورین‌های نسل سوم (سفتازیدیم و سفوپروزان)، کینولون‌ها (مانند سیپروفلوکساسین) و کارباپنم‌ها (شامل ایمی‌پنم، مروپنم) هستند. علاوه بر لیست بالا اخیراً در عفونت‌های سودوموناس با مقاومت فراوان از پلی میکسین استفاده می‌شود. این دارو به دلیل عوارض جانبی در موارد محدودی استفاده می‌شود (۸۳).

یکی از راهبردهای درمان عفونت‌های وخیم در سودوموناس آئروژینوزا استفاده از درمان ترکیبی است. ترکیب یک پنی‌سیلین نیمه سنتتیک مثل تیکارسیلین یا پیراسیلین (با یا بدون متوقف کننده‌های بتالاکتاماز) و یک آمینوگلیکوزید مثل توبرامایسین در محیط *In vitro* فعالیت ضد باکتری موثری را بر ضد سودوموناس

آئروژینوز/ نشان می‌دهد. همچنین در درمان عفونت‌هایی مثل CF از یکی از داروهای کینولون‌ها، بتالاکتامازهای جدید همانند سفوپروزان یا سفتازیدیم، کارباپنم‌ها (ایمی پنم و مروپنم) به همراه یک آمینوگلیکوزید استفاده می‌شود (۸۴).

یک استراتژی دیگر برای افزایش تأثیر داروهای ضد سودوموناسی در عفونت‌های تنفسی همچون CF، استنشاق آنتی بیوتیک‌هایی مثل کاربونی سیلین، جنتامایسین، سفالوسپورین، توبرامایسین، کلی ستین، پلی میکسین B و آمیکاسین است (۸۵ و ۸۶).

۱-۴-۲۱-هدف از تحقیق حاضر

در حال حاضر به سبب حضور بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ایزوله های بیمارستان عامل عفونت، شاهد مشکلات فراوان در بحث درمان و کنترل عفونت ناشی از این ارگانیسم ها به ویژه سویه های سودوموناس آئروژینوز/ که یکی از عوامل اصلی عفونتهای بیمارستانی است می باشیم. در این راستا این مطالعه به بررسی فراوانی بتالاکتامازهای طیف گسترده bla_{TEM} و bla_{SHV} می پردازد.

فصل دوم

اهداف

و فرضیات

هدف اصلی طرح

فراوانی بتالاکتامازهای با طیف گسترده تیپ های TEM و SHV و تیپ بندی مولکولی آنها به روش REP-PCR در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان های شهرهای قزوین و تهران

اهداف فرعی

- غربالگری ایزوله های مقاوم (حساسیت کاهش یافته) های سودوموناس آئروژینوزای به روش دیسک آگار دیفیوژن (DAD) با متد استاندارد Kirby-Bauer (CLSI)
- تعیین فراوانی ایزوله های های سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش فنوتیپی Combined Disc Method
- تعیین توزیع فراوانی ژن های مولد ESBL تیپ های bla_{SHV} و bla_{TEM} در گونه های سودوموناس آئروژینوزای مثبت از نظر فنوتیپی به روش PCR
- تعیین تیپ ایزوله های مولد ESBLs به روش REP-PCR

اهداف کاربردی

نتایج این مطالعه به انتخاب و پیشنهاد آنتی بیوتیک های مناسب و مؤثر در راستای کاهش درمان نامناسب آنتی بیوتیکی (که کاهش بار مالی تحمیلی را به همراه دارد) مؤثر باشد. در ادامه شناسایی عمده ژنهای دخیل در بروز مقاومت از نوع می تواند ضمن نیل به اهداف اپیدمیولوژیک در فرایند طراحی داروهای مؤثر درمانی مورد استفاده قرار بگیرد .

سؤال های پژوهش

- آیا گونه های سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) از فراوانی بالایی برخوردارند؟
- آیا ژن های ESBLs تیپ bla_{TEM} در ایجاد مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های آزرئونام ، سفوتاکسیم ، سفپودوکسیم ، سفتازیدیم ، سفتریاکسون از آمار بالایی برخوردار است؟
- آیا ژن های ESBLs تیپ bla_{SHV} در ایجاد مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های آزرئونام ، سفوتاکسیم ، سفپودوکسیم ، سفتازیدیم ، سفتریاکسون به کار رفته دخیل است؟
- توزیع ژنهای کد کننده ESBLs در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای جمع آوری شده چگونه است؟

فصل سوم

مروری بر مطالعات انجام
شده

✓ طی مطالعاتی که صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۰۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از بیمارستان‌های مختلف شهر اراک انجام دادند، ۴۰ ایزوله مقاوم به ای‌می‌پنم بودند. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، ای‌می‌پنم، جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۱۱/۱٪، ۳۷٪، ۱۵/۷٪، ۲۹/۶٪ و ۱۷/۶٪ بود (۸۷).

✓ در مطالعه دیگری که توسط فولادی سال ۲۰۱۱ در زنجان بر روی ۱۱۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی انجام گرفت درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آمیکاسین، تتراسیکلین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم به ترتیب برابر با ۹۲/۷٪، ۱۷/۳٪، ۸۶/۴٪، ۴۳/۶٪، ۲۵/۵٪، ۲۰/۹٪، ۲۰/۹٪ بود (۸۸).

✓ در مطالعه‌ای که صادقی و همکاران سال ۲۰۱۰ بر روی ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا انجام دادند، درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۷۳٪، ۸۶٪، ۷۳٪، ۵۵٪ بود (۸۹).

✓ Shaikh و همکاران در سال ۲۰۱۴ در هند با مطالعه بر روی ۱۸۷ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا نشان دادند که ۴۷ ایزوله (۲۵/۱۳٪) دارای فنوتیپ ESBLs مثبت هستند. بیشتر ایزوله‌های جدا شده از نمونه خلط بودند (۹۰).

✓ در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ در مصر و توسط EL-baky و همکاران انجام شد از ۵۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا ۴۲ ایزوله (۷۲/۴٪) تولید کننده بتالاکتاماز بودند و ۱۶ ایزوله (۲۷/۵٪)، ایزوله‌های ESBLs مثبت بودند (۹۱).

✓ در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ توسط فرشاد زاده و همکاران در اهواز انجام پذیرفت تعداد ۱۸۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از ایزوله های زخم و بیماران سوختگی جدا گردید. که از این تعداد ۹۶ ایزوله (۵۱/۹٪) دارای فنوتیپ ESBLs مثبت بودند و میزان مقاومت آنها به دیسک های سفتریاکسون (۹۱/۶٪) و به آزترونام (۹۷/۵۷٪) گزارش گردید (۹۲).

✓ در مطالعه ای که در سالهای ۲۰۰۹ توسط Ullah و همکارانش در پاکستان صورت پذیرفت از میان ۱۰۶ ایزوله سودوموناس که از بیماران بخش سوختگی جدا شده بود ۳۸ (۳۵/۸۵٪) از این نمونه ها دارای الگوی فنوتیپی ESBLs مثبت رانشان دادند (۹۳).

✓ شجاعپور و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی تعداد ۱۷۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از ایزوله های بالینی پرداختند. از این تعداد ۶۶ ایزوله (۳۷/۷٪) دارای الگوی ESBLs مثبت بودند که از این مقدار ۱۰ ایزوله (۱۵/۱۵٪) واجد ژن *bla*_{TEM-1} بودند (۹۴).

✓ در مطالعه ای که توسط Jiang و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی ۷۵ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا انجام شد، ۳۶ ایزوله الگوی مقاومت چند دارویی را نشان دادند که از این تعداد ۳۴ ایزوله از نظر حضور بتالاکتام های وسیع الطیف (ESBLs) مثبت بودند. با بررسی مولکولی ژن ها مشخص گردید ۱۳ ایزوله دارای ژن *bla*_{TEM-1} بود (۹۵).

✓ در مطالعه ای که توسط بهمنی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی ۱۲۳ نمونه کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت، ۲۲ ایزوله (۱۷/۸۹٪) تولید کننده ESBLs بودند که با انجام آزمون PCR ۱۲ ایزوله (۱۰/۷۵٪) دارای ژن *bla*_{SHV} بودند (۹۶).

✓ در بررسی که در سال ۲۰۰۹ توسط شاهچراغی و همکارانش بر روی ۶۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از دو بیمارستان در تهران انجام شد ژنهای *bla*_{VEB}، *bla*_{PER} و *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به آزمون PCR به ترتیب ۲۲٪، ۹٪، ۱۷٪، ۲۴٪ دارای ژنهای بتالاکتاماز *bla*_{VEB} و *bla*_{PER} و *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} بودند (۹۷).

✓ در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Lee و همکاران در کره جنوبی بر روی ۲۵۲ نمونه بالینی سودوموناس آئروژینوزا جهت تشخیص ژنهای *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} صورت پذیرفت حضور این ژنها شناسایی نگردید. در این مطالعه ژن *bla*_{PSE-1} (۶/۳٪)، و ژن *bla*_{OXA-10} (۱۳/۱٪) جداسازی شدند (۹۸).

✓ وحدانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی ۲۲۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران بستری بیمارستان مطهری تهران مشخص ساختند (۱۸٪) این باکتریها دارای الگوی فنوتیپی ESBLs مثبت هستند (۹۹).

فصل چهارم

مواد و روشها

۴-۱- نوع پژوهش

پژوهش اخیر یک مطالعه توصیفی - مقطعی (میزان شیوع Prevalence Rate) می باشد.

۴-۲- جامعه مورد مطالعه

نمونه‌های کلینیکی مختلف (شامل نمونه های ادرار، خون، زخم، تراشه، برونکو آلوئولار لاولاژ و خلط) از بیماران بستری یا مراجعه کننده به بیمارستان‌های مختلف شهر های تهران و قزوین جمع آوری گردید. تعداد ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بطور تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت تا میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشخص گردد. سپس در سویه‌های مقاوم (فنوتیپی) حضور ژن‌های- bla_{SHV} و bla_{TEM} مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۴-۱: متغیرها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده						*	براساس نتایج فنوتیپی و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد	حساس/مقاوم یا مقاومت حد واسط)
فنوتیپ ESBL					x		بررسی مقایسه ای افزایش قطر هاله عدم رشد به میزان بیش از 5mm	دارد/ندارد
حضور ژن های bla_{SHV} , bla_{TEM}					x		انجام PCR و انجام الکتروفورز محصول PCR انجام الکتروفورز و بکارگیری سائز مارکرهای مربوطه و مشاهده چشمی باند	حضور دارد/ندارد

۴-۳- واحد پژوهش

۲۶۶ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های شهرهای تهران و قزوین.

۴-۴- متغیرها

سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا: متغیر زمینه‌ای-پیوسته اسمی

bla_{SHV} و bla_{TEM} : متغیر زمینه‌ای-پیوسته اسمی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی: متغیر زمینه‌ای- پیوسته اسمی

۴-۵- روش انتخاب نمونه

حجم نمونه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شده است:

۴-۶- روش اجرای پژوهش

۴-۶-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها

جهت انجام این مطالعه در مجموع ۲۶۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان امام حسین (ع) شهر تهران و بیمارستان‌های بوعلی، کوثر، قدس و شهید رجایی شهر قزوین جمع‌آوری گردید. باکتری‌ها از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، خلط، زخم، و تراشه جدا شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه مجدداً تایید هویت گردیدند. ایزوله‌های تایید شده، در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایشات بعدی نگهداری شدند.

۴-۶-۲- شناسایی و تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده

جهت تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده، از تست‌های بیوشیمیایی مختلف استفاده شد. این تست‌ها شامل رشد در محیط مک‌کانکی آگار، تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI^{46} ، تست OF^{47} بررسی تحرک، رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد و تولید پیوسیانین در محیط مولر هیتون آگار بود.

۴-۶-۳- محیط کشت‌های مورد نیاز

محیط‌های به کار رفته جهت تعیین هویت سودوموناس آئروژینوزا عبارتند از:

محیط مک‌کانکی آگار، اکسیداتیو-فرمانتاتیو، تریپل شوگر آیرون آگار، SIM و مولر هیتون آگار.

۴-۶-۳-۱- محیط مک‌کانکی آگار

محیط مک‌کانکی آگار برای بررسی مصرف قند لاکتوز توسط باکتری‌ها به کار می‌رود. این محیط حاوی پپتون، نمک صفرا، لاکتوز، کلرید سدیم و نوترال رد می‌باشد.

۴-۶-۳-۲- محیط OF

این محیط برای تشخیص نوع مصرف قند در باکتری‌های گرم منفی میله‌ای غیر تخمیری مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۴-۶-۳-۳- محیط TSI

محیط TSI برای تشخیص مصرف قندهای گلوکز، لاکتوز، ساکاروز و همچنین تولید گاز سولفید هیدروژن توسط باکتری به کار می‌رود.

۴-۶-۳-۴- محیط SIM

محیط SIM، محیطی نیمه جامد است و برای تعیین تولید SH_2 ، اندول و حرکت (motility) به کار می‌رود.

⁴⁶-Triple Sugar Iron Agar

⁴⁷-Oxidative – Fermentation

۴-۶-۴- نگهداری ایزوله‌ها

پس از تأیید نهایی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف حدود ۱ الی ۴ کلنی به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری حاوی محیط تریپتی کیس سوی براث واجد ۲۰ درصد گلیسرول منتقل و پس از حل نمودن کلنی‌ها در محیط مزبور، میکروتیوب‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس با دیدن کدورت محیط که ناشی از رشد باکتری‌ها می‌باشد، میکروتیوب‌ها را ابتدا به مدت ۱ الی ۴ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس جهت نگهداری بلند مدت به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل نمودیم (نگهداری در یخچال قبل از فریز کردن نمونه‌ها جهت جلوگیری از شوک سرمایی مفید می‌باشد). در طی مدت زمان نگهداری ایزوله‌ها تا شروع مرحله تشخیص مولکولی، به صورت تصادفی به فاصله هفتگی، ماهانه و سه ماهه تعدادی از نمونه‌ها از فریزر خارج و بعد از دفریز شدن در محیط مولر هیتون براث دوباره کشت داده شدند تا اطمینان حاصل شود در طی مدت زمان فریز شدن باکتری، از قدرت رشد کنندگی آنها کاسته نشده باشد.

۴-۶-۵- بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با Disk Diffusion Method :

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا توسط تست آنتی‌بیوگرام (دیسک دیفیوژن) انجام شد که متداول ترین تست مورد استفاده جهت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی آگار می‌باشد. این تست بر اساس انتشار در دیسک و بر اساس دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI) به استفاده از ۵ دیسک آنتی‌بیوتیک مختلف انجام شد. از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 جهت کنترل کیفی آزمون استفاده شد (۸۰).

۴-۶-۵-۱- مواد و وسایل مورد نیاز تست آنتی‌بیوگرام

- محیط کشت مولر هیتون آگار
- دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت MAST، انگلستان):
- آزترئونام (۳۰ میلی گرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میلی گرم)، سفپودوکسیم (۳۰ میلی گرم)، سفنازیدیم (۳۰ میلی گرم)، سفتریاکسون (۳۰ میلی گرم)، براساس جداول استاندارد CLSI.

- اسیدسولفوریک و کلریدباریوم جهت تهیه نیم مک فارلند.

- سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853

- پلیت‌های یکبار مصرف ۱۰ سانتی متری

- سواب پنبه‌ای استریل و پنس

- لوله آزمایش حاوی ۱ تا ۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل

- لوله حاوی استاندارد نیم مک فارلند

- خط کش مخصوص اندازه گیری قطر هاله عدم رشد

۴-۶-۵-۲- تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند، از کلنی‌های تازه (۲۴-۱۸ ساعته) و خالص سودوموناس آئروژینوزا در لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل تلقیح کرده، سپس با مقایسه کدورت آن با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه نمودیم. جذب نوری یا OD این سوسپانسیون در طول موج ۶۲۵ نانومتر بایستی حدود ۰/۰۸ تا ۰/۱ باشد.

۴-۶-۵-۳- کنترل کیفی دیسک‌ها

تمامی دیسک‌های آنتی بیوتیکی قبل از استفاده برای آزمایش، از لحاظ کیفیت کنترل شدند. برای این منظور ابتدا سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک فارلند) به روش مستقیم از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC278531 تهیه شد، سپس توسط سواب استریل روی محیط مولر هیتون آگارکشت خطی داده شد. در نهایت، دیسک‌ها با فاصله ۲۲ میلیمتر از یکدیگر و ۱۶ میلی‌متر از جداره پلیت بر روی محیط قرار داده شدند.

۴-۶-۵-۴- روش کار تست آنتی بیوگرام

جهت انجام تست آنتی بیوگرام ابتدا سوسپانسیون باکتریایی معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه کردیم. به این صورت که چند کلنی خالص سودوموناس آئروژینوزا را در لوله‌های ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی تلقیح کرده، سپس لوله‌ها را در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم تا به کدورت مورد نظر برسند (کدورت معادل نیم مک فارلند). در مرحله بعد به کمک سواب پنبه‌ای کشت چمنی روی محیط مولر هیتون آگار انجام دادیم. پس از گذشت ۱۵ دقیقه از کشت، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط کشت قرار داده شدند و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از قرار دادن دیسک‌ها، پلیت‌ها در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه گردید. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه‌گیری و تفسیر آن باتوجه به استانداردهای CLSI انجام گرفت و بر حسب قطر هاله عدم رشد، ایزوله‌ها به ۳ گروه حساس، حد متوسط و مقاوم تقسیم بندی شدند (۸۰).

۴-۶-۶-۴- آزمایش دیسک ترکیبی جهت تشخیص فنوتیپی ESBLs ها

۴-۶-۶-۱- وسایل و مواد لازم

- آنتی‌بیوتیک های سفنازیدیم، سفوتاکسیم، آزترونام، سفپودوکسیم و سفتریاکسون
- محلول استاندارد نیم مک فارلند
- سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853
- پلیت‌های یک بار مصرف ۱۲ سانتی متری
- سواب‌های پنبه‌ای استریل و پنس
- لوله‌های آزمایش حاوی ۱ تا ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل
- خط کش مخصوص اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد

۴-۶-۲- روش کار تست غربالگری ESBLs

ابتدا تمامی ایزوله ها بر طبق دستورالعمل استاندارد با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، سفوتاکسیم، آزترونام، سفیدوکسیم و سفتریاکسون مورد غربالگری قرار می گیرند.

- تست تاییدی ESBLs: ایزوله هایی دارای کاهش حساسیت نسبت به هر کدام از آنتی بیوتیک های مرحله غربالگری توسط تست تاییدی تولید ESBLs به روش دیسک ترکیبی (Combined Disk Method) مورد بررسی قرار می گیرند. در این آزمون از دیسکهای سفتازیدیم و سفتازیدیم / کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم و سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید استفاده می شود. نتایج طبق دستورالعمل CLSI تفسیر می گردد بدین صورت که افزایش قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی معادل $5 \text{ mm} \geq$ در مقایسه با قطر هاله عدم رشد دیسک به تنهایی باشد از نظر ESBLs مثبت در نظر می گیریم.
- در آزمون های فنوتیپی از *E.coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و از *E.coli* ATCC 35218 و *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت استفاده می شود (۸۰).

۴-۶-۳- آماده کردن سوسپانسیون میکروبی و تلقیح آن

ابتدا از نمونه ها یک سوسپانسیون میکروبی دارای کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند ($1 \times 10^8 - 2 \times 10^8$) تهیه گردید سپس به میزان ۱:۱۰ با سالین رقیق شد که تقریباً معادل (1×10^7) است سپس از این سوسپانسیون باکتریایی بعد از مخلوط کردن مقدار ۲ میکرولیتر با استفاده از میکروپیت برداشته و بر روی محیط مولر هیتون آگار قرار دادیم. تلقیح نهایی روی آگار تقریباً معادل 10^4 CFU در هر نقطه می باشد. کلیه مراحل در شرایط کاملاً آسپتیک انجام شد. بعد از تلقیح نمونه ها پلیت ها در دمای $35-37$ درجه سانتی گراد بمدت ۱۶-۲۰ ساعت انکوبه شد کلیه مراحل فوق بر روی یک پلیت فاقد آنتی بیوتیک بعنوان کنترل مثبت نیز انجام گرفت. هم چنین در هر پلیت خانه ای برای سویه استاندارد و کنترل منفی که تلقیح میکروبی در آن انجام نمی شود در نظر گرفته شد.

۴-۶-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

همه ایزوله های مولد ESBL از نظر حضور ژن های *bla*_{TEM} , *bla*_{SHV} با استفاده از پرایمر های اختصاصی (جدول ۳-۲) بررسی شدند.

سپس شرایط واکنش PCR جهت تکثیر تک تک ژن ها با سویه استاندارد بهینه سازی شد. در نهایت، ایزوله های بالینی به منظور شناسایی هر دو ژن ارزیابی شدند.

۴-۶-۷-۱- استخراج DNA:

مواد و وسایل مورد نیاز

- سمپلر و سر سمپلر
- میکروتیوب ۱/۵
- شیکر (shaker)
- میکروسانتریفیوژ
- انکوباتور ۳۷ درجه
- بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد
- نانودراپ

مراحل استخراج DNA با استفاده از روش boiling به شرح ذیل انجام گرفت:

۱. برای استخراج DNA به روش boiling نیاز به کلنی هایی از کشت تازه (۲۴ ساعته) داریم، به این منظور نمونه هایی که در آزمون فنوتیپی از نظر تولید ESBLs مثبت شدند برای استخراج DNA کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و رشد ایزوله های مورد نظر آماده استخراج شدند.
۲. ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۲۰۰ μ l آب مقطر استریل حل کردیم.

۳. با استفاده از شیکر آن قدر نمونه ها را shake می کنیم تا اینکه کاملاً حل شوند.
۴. ویال ها را به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه، داخل بن ماری جوش (۱۰۰ درجه سانتی گراد)، قرار دادیم به طوری که سطح آب جوش دو سوم ویال را در بر گیرد.
۵. سپس ویال ها را به مدت ۱۰-۵ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰ g (با استفاده از سانتریفوژ اپندورف)، سانتریفوژ کردیم و محلول رویی (سوپرناتانت) ویال ها که حاوی DNA می باشد، برای انجام واکنش PCR به اپندورف استریل منتقل شد.

استخراج به این روش به صورت روزانه انجام گرفت و برای حصول به نتایج بهتر در PCR، DNA استخراج شده ذخیره نمی شد.

۴-۶-۷-۲-ارزیابی کمی DNA استخراج شده

با روش UV اسپکتروفتومتری غلظت و خلوص نمونه DNA استخراج شده به کمک جذب نوری در طول موج ۲۶۰ nm و ۲۸۰ با استفاده از رابطه ی زیر بدست می آید.

ضریب خاموشی DNA \times عکس رقت \times OD قرائت شده در ۲۶۰ نانومتر = ($\mu\text{g/ml}$) مقدار DNA

ضریب خاموشی DNA، ۵۰ می باشد. ابتدا نمونه DNA استخراج شده را به نسبت ۵ به ۴۹۵ میکرولیتر با آب مقطر استریل رقیق کرده و سپس میزان جذب نوری یا OD آن را در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری کردیم.

۴-۶-۷-۳- مواد مورد نیاز جهت انجام PCR:

- dNTPs (نوکلئوتیدها)
- پرایمر پیشرو (F) و پیرو (R)
- DNA الگو
- Taq DNA Polymerase
- آب مقطر دیونیزه

▪ بافر PCR-10x

۴-۶-۷-۴- پروسه انجام واکنش PCR

۴-۶-۷-۴-۱- مواد و وسایل مورد نیاز

- ست سمپلر و سر سمپلر آبی، زرد، کریستالی
- میکروتیوب ۲۰۰ μ l-۵۰۰
- دستگاه ترموسایکلر
- ظرف یخ (تمام مراحل تهیه سوسپانسیون اصلی و افزودن DNA الگو و آنزیم Taq DNA polymerase باید بر روی یخ انجام گیرد).
- آب مقطر دیونیزه
- سویه های کنترل مثبت
- پرایمرهای اختصاصی
- Master Mix

۴-۶-۸- تکثیر آنزیم های TEM و SHV

۴-۶-۸-۱- پرایمرهای مورد استفاده

پرایمرهای مورد استفاده در PCR به صورت کاملاً اختصاصی و مکمل ناحیه مورد نظر از DNA هدف طراحی می شوند. توالی پرایمرهای مورد استفاده بر اساس مطالعه Shibata و همکارانش بوده و توسط شرکت ماکروژن کره سنتز شده است. توالی و اندازه قطعات تکثیر شده توسط این پرایمرها در جدول 4-۲ ذکر شده است.

جدول ۴-۲: پرایمرهای مورد استفاده آزمون PCR

ژن	توالی پرایمر	رفنس
<i>bla_{SHV}</i>	F: 5-CTT TAC TCG CCT TTA TCG -3 R: 5-TCC CGC AGA TAA ATC ACC A -3	۱۰۰
<i>bla_{TEM}</i>	F: 5-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG -3 R: 5-GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A -3	۱۰۰

۴-۶-۸-۲- حجم و غلظت مواد PCR جهت تکثیر آنزیم‌های *bla_{SHV}* و *bla_{TEM}*:

واکنش PCR برای هر یک از ژن‌های در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام گرفت. غلظت و حجم نهایی مواد PCR در جدول ۴-۳ ذکر شده است.

جدول ۴-۳: حجم و غلظت نهایی مواد PCR برای ژن‌های *bla_{SHV}* , *bla_{TEM}*

غلظت	حجم (میکرو لیتر)	ترکیبات واکنش
-	۲۱/۷۵	Master Mix
۱۰ pmol	۱	Primer Forward
۱۰ pmol	۱	Primer Reverse
-	۰/۲۵	Taq pol 5 u/μl
-	۱	Template DNA
-	۲۵	حجم نهایی

۴-۶-۳- برنامه دمایی جهت تکثیر ژن‌های *bla_{TEM}* و *bla_{SHV}*

برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های *bla_{SHV}*، *bla_{TEM}* در جدول ۴-۴ نشان داده شده است.

جدول ۴-۴: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های *bla_{TEM}*، *bla_{SHV}*

ژن	initial denaturation	denaturation	annealing	extension	final extension
<i>bla_{SHV}</i>	°C for ۹۶ min ۵	°C for ۹۶ min ۱	°C for ۴۹ min ۱	°C for ۷۲ min ۱	°C for ۷۲ min ۱۰
<i>bla_{TEM}</i>	°C for ۹۶ min ۵	°C for ۹۶ min ۱	°C for ۵۰ min ۱	°C for ۷۲ min ۱	°C for ۷۲ min ۱۰

۴-۶-۹- آشکارسازی و الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز

این مرحله از آزمایشات به منظور ارزیابی محصولات PCR انجام شد.

۴-۶-۹-۱- مواد و وسایل مورد نیاز برای الکتروفورز

- دستگاه الکتروفورز
- سمپلر و سر سمپلر
- پودر آگارز
- DNA Size marker یا DNA Ladder (۱۰۰bp)
- Loading buffer و اتیدیوم بروماید
- TBE buffer X

۳-۶-۹-۲-محلول رنگ آمیزی

جهت شناسایی DNA و محصول PCR در داخل ژل نیاز به رنگ آمیزی ژل داریم تا محل قرارگیری محصولات ما را مشخص کند، محلول های مختلفی برای رنگ آمیزی استفاده می شود، محلول مورد استفاده در این مطالعه اتیدیوم بروماید بود که جزء مواد ایتترکاله شونده می باشد، این محلول از طریق قرارگیری در بین بازهای DNA محل محصول را در سطح ژل مشخص می کند، جهت شناسایی بایستی ژل را در معرض اشعه ماوراءبنفش قراردهیم تا اتیدیوم بروماید فلورسانس نارنجی ایجاد نماید. از مخاطرات استفاده از این محلول سرطان زائی آن می باشد لذا در هنگام استفاده باید کلیه نکات ایمنی رعایت و از دستکش و ماسک مناسب و استاندارد استفاده نمود. جهت تهیه محلول استوک و ذخیره بایستی ۱۰ میلی گرم از پودر تجاری اتیدیوم بروماید را در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و در ظرف در بسته و به دور از نور مستقیم نگهداری نمائیم.

۴-۶-۹-۳-انجام الکتروفورز و روش تهیه ژل

در این مطالعه با توجه به وزن ژن های مورد نظر، ژل ۱٪ تهیه شد. برای تهیه ژل ۱٪ در قالب کوچک، ۱/۳ گرم پودر آگارز در ۱۳۰ میلی لیتر بافر TBE ۱X حل کرده و آن را می جوشانیم تا کاملاً آگارز در داخل بافر حل شود و محلول شفاف گردد. پس از رسیدن دمای محلول آگارز ساخته شده به حدود ۴۵ تا ۵۰ درجه به ازای هر ۱۰ میلی لیتر ژل، یک میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید اضافه شده و در نهایت ژل داخل قالب ریخته می شود. بعد از بستن کامل ژل ابتدا شانه را در آورده و ژل در داخل تانک الکتروفورز قرار می گیرد. داخل تانک به حدی بافر TBE می ریزیم که روی ژل را کاملاً بپوشاند. ۵ میکرولیتر از محصول PCR را با یک میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملاً مخلوط کرده و سپس به آرامی داخل چاهک ها قرار می گیرد. از آنجایی که DNA شارژ منفی دارد، به همین علت برای الکتروفورز شدن باید نمونه ها به طرف قطبی منفی باشد تا موقع الکتروفورز به سمت قطب مثبت حرکت کند. تانک الکتروفورز به منبع برق وصل شده و ولتاژ تنظیم شده (۷۰-۸۰V) و الکتروفورز شروع می شود. وقتی نمونه ۷۵٪ طول ژل را طی کرد ژل از تانک خارج شده و با دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده می شود. می توان عکس ژل را توسط دستگاه ژل داک تهیه کرد.

۴-۶-۱۰- تعیین توالی (Sequencing):

محصول PCR هر یک از ژن ها جداگانه از نظر تائید حضور ژن توسط شرکت ژن فن آوران به شرکت MacroGene (کره جنوبی) ارسال شد. پس از دریافت نتایج توالی ها با نرم افزار chromas بررسی و سپس جهت آنالیز ابتدا در NCBI ، blast شده و با ژن های سویه های استاندارد ثبت شده در این بانک ژنی alignment انجام شد.

۴-۶-۱۱- REP- PCR

همه ایزوله های مولد ESBL با استفاده از پرایمر های اختصاصی (جدول ۵-۳) به روش REP- PCR بررسی شدند.

جدول ۴-۵: پرایمرهای بکار رفته جهت انجام REP-PCR (۱۰۱)

REP1 (5ϕ-IIIGCGCCGICATCAGGC-3ϕ)	پرایمر های REP-PCR
REP2 (5ϕ-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3ϕ)	

جدول ۴-۶: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام REP-PCR

ژن	initial denaturation	denaturation	annealing	extension	final extension
	°C for ۹۴	°C for ۹۴	°C for ۴۵	°C for ۷۲	°C for ۷۲
	min ۱۰	min ۱	min ۱	min ۲	min ۱۶



فصل پنجم

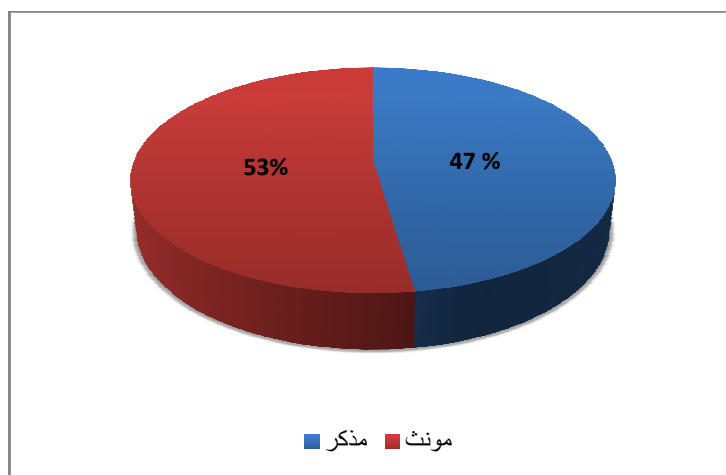
نتایج

۵-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها:

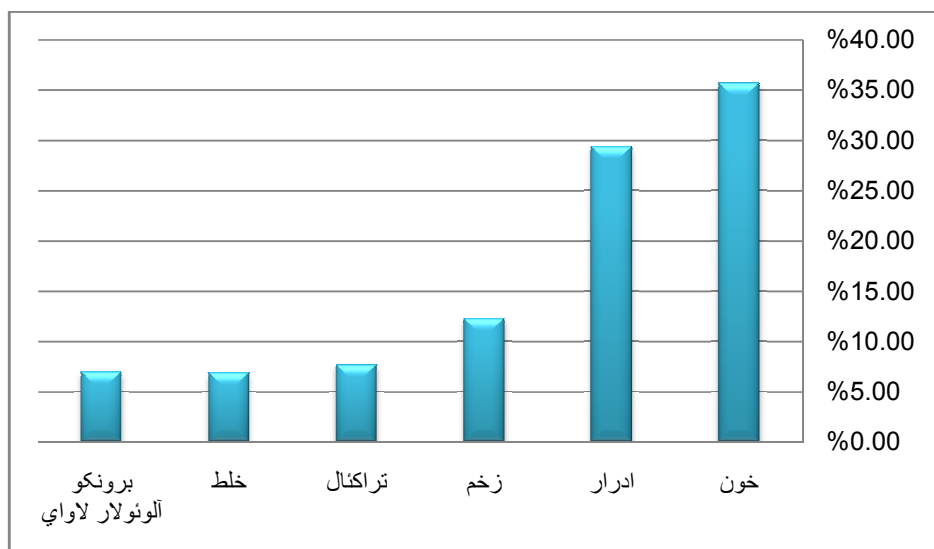
در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ۲۶۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، برونکوآلوئولار لاواژ، زخم، خلط و تراشه از بیمارستان امام حسین (ع) شهر تهران و بیمارستان‌های بوعلی، شهید رجائی، کوثر و ولایت شهر قزوین جمع‌آوری گردید.

۵-۲- توزیع فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده بر اساس جنسیت و نوع نمونه بالینی:

از ۲۶۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی، ۸۰ (۳۰/۱٪) ایزوله مربوط به نمونه‌های ادرار، ۹۴ (۳۵/۳٪) ایزوله مربوط به خون، ۱۸ (۶/۸٪) ایزوله مربوط به برونکو آلوئولار لاواژ، ۲۹ (۱۰/۹٪) ایزوله مربوط به زخم، ۱۹ (۷/۱٪) ایزوله مربوط به خلط و ۲۶ (۹/۸٪) ایزوله مربوط به تراشه بود (نمودار ۴-۲). از نمونه‌های بالینی مورد بررسی، ۱۲۵ (۴۷٪) نمونه مربوط به جنس مرد و ۱۴۱ (۵۳٪) نمونه مربوط به زنان بودند که در نمودار ۴-۱ نشان داده شده است.



نمودار ۵-۱: توزیع فراوانی نسبی ایزوله‌های جمع‌آوری شده بر اساس جنسیت



نمودار ۵-۲: توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مختلف به کار رفته در این مطالعه

۵-۳- توزیع فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده بر اساس بخش جدا شده:

از ۲۶۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی، ۹۹ ایزوله (۳۷/۲٪) از بخش مراقبتهای ویژه، ۶۴ ایزوله (۲۴/۱٪) از بخش داخلی، ۶۱ ایزوله (۲۲/۹٪) از بخش عفونی، ۲۶ ایزوله (۹/۸٪) از بخش جراحی، ۱۲ ایزوله (۴/۵٪) از بخش جراحی اعصاب و ۴ ایزوله (۱/۵٪) از بخش اعصاب جدا سازی شده است. (جدول ۴-۱)

جدول ۵-۱: جدول فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده بر حسب بخش بیمارستانی

بخش فراوانی	داخلی	عفونی	مراقبت ویژه	اعصاب	جراحی	جراحی اعصاب
تعداد ایزوله جدا شده	۶۴	۶۱	۹۹	۴	۲۶	۱۲
درصد ایزوله جدا شده	(۲۴/۱٪)	(۲۲/۹٪)	(۳۷/۲٪)	(۱/۵٪)	(۹/۸٪)	(۴/۵٪)
تعداد کل	۲۶۶					

۴-۵- تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا:

جهت تأیید ایزوله‌ها از تست‌های میکروب شناسی و بیوشیمیایی مختلف استفاده شد. این تست‌ها شامل بررسی میکروسکوپی، رشد در محیط مک کانکی آگار، تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI، تست OF، بررسی تحرک، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد، رشد در محیط سیتريمید آگار و تولید پیگمان در محیط مولر هینتون آگار بود.



تصویر ۵-۱: آزمایش‌های فنوتیپی. از راست به چپ به ترتیب: محیط SIM، آزمون OF، ALK/ALK TSI

۵-۵- تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

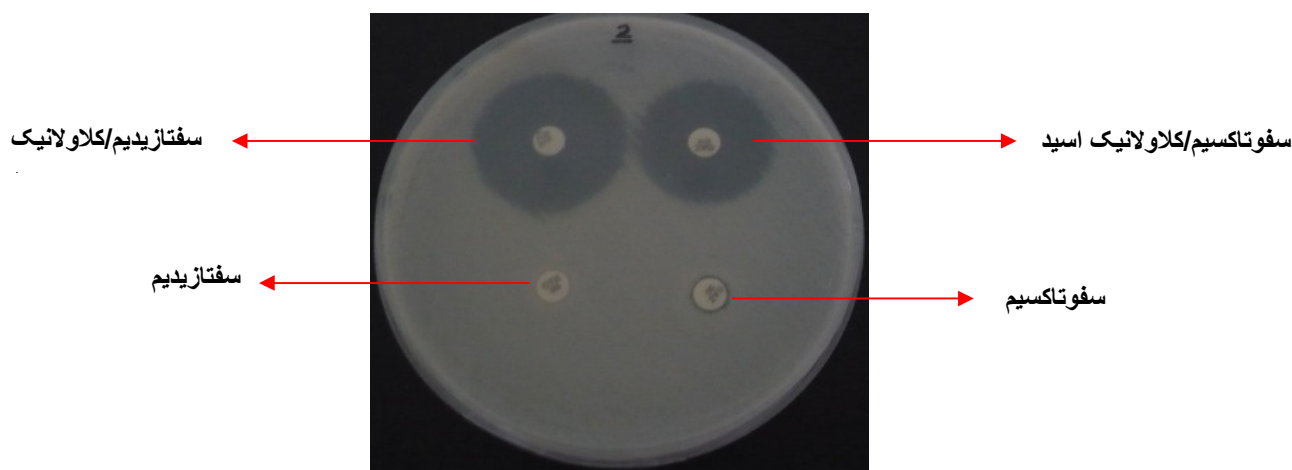
الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در جدول ۴-۲ بیان شده است. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سفپودوکسیم (۹۸/۵٪) و سفوتاکسیم (۵۳٪) و کمترین میزان مقاومت مربوط به سفتازیدیم (۳۶/۵٪) گزارش شد.

جدول ۵-۲: بررسی غربالگری ایزوله های مولد ESBL در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده در این مطالعه

آنتی بیوتیک	مقاوم تعداد (%)	حدواسط تعداد (%)	حساس تعداد (%)
سفیدوکسیم	۲۶۲ (۹۸/۵)	۰	۴ (۱/۵)
سفوتاکسیم	۱۴۱ (۵۳)	۱۰۳ (۳۸/۷)	۲۲ (۸/۳)
سفتریاکسون	۱۲۳ (۴۶/۲)	۷۸ (۲۹/۴)	۶۵ (۲۴/۴)
آزترونام	۱۰۰ (۳۷/۶)	۶۵ (۲۴/۴)	۱۰۱ (۳۸)
سفتازیدیم	۹۷ (۳۶/۵)	۱۶ (۶)	۱۵۳ (۵۷/۵)

۵-۵-۱- نتایج آزمون تاییدی تولید ESBL (Combined Disk Method):

در روش دیسک ترکیبی از دیسکهای ۳۰ میکروگرمی سفتازیدیم و سفوتاکسیم در مجاورت دیسکهای مذکور به همراه ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید در محیط مولر هیتون آگار استفاده شد. در صورتی که قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسکهای شامل کلاولانیک اسید در مقایسه با بدون آن ۵ میلی متر و یا بیشتر باشد مولد بتالاکتاماز طیف وسیع در نظر گرفته می شود. در این مطالعه از ۲۶۶ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا، ۷۵ (۲۸/۶٪) ایزوله تولید کننده دارای ESBL گزارش شدند.



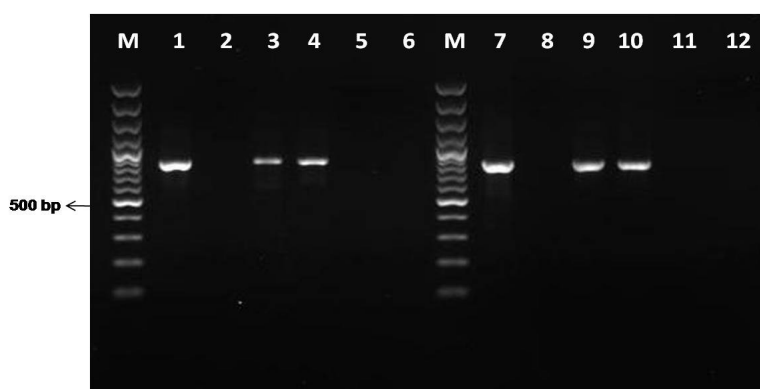
تصویر ۵-۲: تست تاییدی فنوتیپی جهت شناسایی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مولد ESBL

۵-۶- آزمایش PCR برای جدا سازی ژنهای کد کننده:

در ادامه جداسازی ژنهای *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} در ایزوله های مولد ESBLs با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با انجام آزمون PCR انجام شد. از ۷۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مولد ESBLs، ۲۰ ایزوله (۲۶/۷٪) حامل ژن *bla*_{TEM}، و ۸ ایزوله حامل ژن (۱۰/۷٪) *bla*_{SHV} بودند. جدول مربوط به فراوانی ژنها در جدول ۳-۴ آمده است.

جدول ۳-۵: فراوانی ژنهای *bla*_{SHV} و *bla*_{TEM} در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مولد ESBL

ژن	تعداد	درصد
<i>bla</i> _{TEM}	۲۰	(۲۶/۷٪)
<i>bla</i> _{SHV}	۸	(۱۰/۷٪)



تصویر ۳-۵: سمت چپ: محصول PCR از نظر حضور ژن *bla*_{TEM}. ستون M: DNA مارکر؛ ستون ۱: کنترل مثبت؛ ستون ۲: کنترل منفی (*E. coli* ATCC25922)؛ ستون ۳ و ۴: نمونه بالینی مثبت؛ ستون ۵: واکنش PCR بدون DNA الگو؛ ستون ۶: نمونه بالینی منفی

سمت راست: محصول PCR از نظر حضور ژن *bla*_{SHV}. ستون M: DNA مارکر؛ ستون ۷: کنترل مثبت (*Klebsiella pneumoniae* ATCC700603)؛ ستون ۸: کنترل منفی (*E. coli* ATCC25922)؛ ستون ۹ و ۱۰: نمونه بالینی مثبت؛ ستون ۱۱: واکنش PCR بدون DNA الگو؛ ستون ۱۲: نمونه بالینی منفی

۷-۵- تعیین توالی (Sequencing):

در ادامه با تعیین توالی ایزوله های مثبت از نظر حضور ژن مشخص گردید که ایزوله های حامل ژن bla_{SHV-1} (%۶/۷) از نوع bla_{SHV} (%۲۶/۷) و ایزوله های مولد bla_{TEM-1} همگی از نوع bla_{TEM} (%۴) بودند. جدول مربوط به فراوانی هر یک از ژنها در جدول ۴-۴ آمده است. نتایج bla_{SHV-12} و با ژن های سویه های استاندارد ثبت شده در bla_{SHV-1} ، bla_{SHV-12} و bla_{SHV-1} ژن های alignment در شکل های ۴-۴، ۴-۵ و ۶-۴ آورده شده است. NCBI

جدول ۴-۵: فراوانی ژنهای bla_{SHV} و bla_{TEM} بعد از تعیین توالی ژنهای کد کننده آنها

ژن	تعداد مثبت	تعداد منفی	درصد
bla_{SHV-1}	۵	۷۰	(%۶/۷)
bla_{SHV-12}	۳	۷۲	(%۴)
bla_{TEM-1}	۲۰	۵۵	(%۲۶/۷)

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

SHV
Eh, SHV
Consensus
ATGCGTATATTCGCTGTGTATATATCTCCCTGTTAGCCAC-CCTGCCGCTGGCGGGTACACGACGACCCGACGCGCTTGAACAAATTAACCTAAGCGAAGCCAGCTGTGCGGCCGCTAGGCATGATA
AGGGGGACTTCGAGCTTCACCTGCCGCTGGCGGTA-ACGCCAGCCCGACGCGCTTGAACAAATTAACCTAAGCGAAGCCAGCTGTGCGGCCGCTAGGCATGATA
.....agagcgaCtGcaaGCaC.CCTGCCGCTGGCGGTA.ACGCCAGCCCGACGCGCTTGAACAAATTAACCTAAGCGAAGCCAGCTGTGCGGCCGCTAGGCATGATA

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

SHV
Eh, SHV
Consensus
GAATGGATCTGGCCAGCGGCCGACGCTGACCGCTGGCGCGCGATGACGCTTTCCCATGATGACGACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGACAGC
GAATGGATCTGGCCAGCGGCCGACGCTGACCGCTGGCGCGCGATGACGCTTTCCCATGATGACGACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGACAGC
GAATGGATCTGGCCAGCGGCCGACGCTGACCGCTGGCGCGCGATGACGCTTTCCCATGATGACGACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGACAGC

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

SHV
Eh, SHV
Consensus
TGGAGCGAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAARACACCTTGGCGACGGCATGACGGTCGGCGAAGCTCTGCGCCGCCCATTACCATGAGCGATACAGCGC
TGGAGCGAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAARACACCTTGGCGACGGCATGACGGTCGGCGAAGCTCTGCGCCGCCCATTACCATGAGCGATACAGCGC
TGGAGCGAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAARACACCTTGGCGACGGCATGACGGTCGGCGAAGCTCTGCGCCGCCCATTACCATGAGCGATACAGCGC

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520

SHV
Eh, SHV
Consensus
CGCCAACTGCTGCTGGCCACCCTCGCGGCCCGCAGGATTGACTGCCCTTTTGGCGCAGATCGCGACACGCTACCCGCTTGAACGCTGGGAACGGAGCTGARTGAGGCGCTTCCCGCGACGCC
CGCCAACTGCTGCTGGCCACCCTCGCGGCCCGCAGGATTGACTGCCCTTTTGGCGCAGATCGCGACACGCTACCCGCTTGAACGCTGGGAACGGAGCTGARTGAGGCGCTTCCCGCGACGCC
CGCCAACTGCTGCTGGCCACCCTCGCGGCCCGCAGGATTGACTGCCCTTTTGGCGCAGATCGCGACACGCTACCCGCTTGAACGCTGGGAACGGAGCTGARTGAGGCGCTTCCCGCGACGCC

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650

SHV
Eh, SHV
Consensus
CGCGACCCACTACCCCGCGCAGATGGCCGCGACCTGCGCAGCTGCTGACGACGCGCTGAGCGCCGCTCGACACGGCAGCTGCTGAGTGGATGGTGGACGATCGGTCGCGGACCGTTGA
CGCGACCCACTACCCCGCGCAGATGGCCGCGACCTGCGCAGCTGCTGACGACGCGCTGAGCGCCGCTCGACACGGCAGCTGCTGAGTGGATGGTGGACGATCGGTCGCGGACCGTTGA
CGCGACCCACTACCCCGCGCAGATGGCCGCGACCTGCGCAGCTGCTGACGACGCGCTGAGCGCCGCTCGACACGGCAGCTGCTGAGTGGATGGTGGACGATCGGTCGCGGACCGTTGA

651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780

SHV
Eh, SHV
Consensus
TCGCTCCGCTGCTGCGCGGGCTGGTTTATCGCGATAGACCGAGCTGGCGAGCGGGTGGCGCGGCTTGTGCGCTGCTTGGCCGATACCAAGCAGAGCGCATTTGGTGATTATCTGCG
TCGCTCCGCTGCTGCGCGGGCTGGTTTATCGCGATAGACCGAGCTGGCGAGCGGGTGGCGCGGCTTGTGCGCTGCTTGGCCGATACCAAGCAGAGCGCATTTGGTGATTATCTGCG
TCGCTCCGCTGCTGCGCGGGCTGGTTTATCGCGATAGACCGAGCTGGCGAGCGGGTGGCGCGGCTTGTGCGCTGCTTGGCCGATACCAAGCAGAGCGCATTTGGTGATTATCTGCG

781 790 800 810 820 830 840 850 860 870 879

SHV
Eh, SHV
Consensus
GGATACCGCGGAGCATGGCCGAGCGAATCAGCAATCGCCGGATCGCGCGGCGCTGATGAGCACTGGCAA-CGCTAA
GGATACCGCGGAGCATGGCCGAGCGAATCAGCAATCGCCGGATCGCGCGGCGCTGATGAGCACTGGCAAACGCTAAACACACCAAAAAA
GGATACCGCGGAGCATGGCCGAGCGAATCAGCAATCGCCGGATCGCGCGGCGCTGATGAGCACTGGCAA.CGCTAA.....

*bla*_{SHV-1} زن Alignment : تصویر ۴-۵

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

TEM
Eh, TEM
Consensus
ATGAGTATTCACATTTTCGTGTGCGCTTATTCCTTTTGGCGGATTTTGCCCTTCTGTTTGTCTACCCAGAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTT
GGGCCATATTC-TTTTTGGCG-ATTTTGCCCTTCTGTTTGTCTACCCAGAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTT
.....cGcCaTATTC.TTTTTGGCG.ATTTTGCCCTTCTGTTTGTCTACCCAGAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTT

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

TEM
Eh, TEM
Consensus
ACATCGAATCGATCTCAGACGCGGTAGATCCTTGAAGTCTTTCGCCCCGAGGAGCTTTCCCATGATGAGCACTTTAAAGTCTGCTATGTTGGTGGGATATTATCCCGTGTGACGCGGGCAGAG
ACATCGAATCGATCTCAGACGCGGTAGATCCTTGAAGTCTTTCGCCCCGAGGAGCTTTCCCATGATGAGCACTTTAAAGTCTGCTATGTTGGTGGGATATTATCCCGTGTGACGCGGGCAGAG
ACATCGAATCGATCTCAGACGCGGTAGATCCTTGAAGTCTTTCGCCCCGAGGAGCTTTCCCATGATGAGCACTTTAAAGTCTGCTATGTTGGTGGGATATTATCCCGTGTGACGCGGGCAGAG

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

TEM
Eh, TEM
Consensus
GCAACTCGGTGCGCCGATACATATTCTCAGATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAGAGATATTGAGTGTGCCATACCATGAGTGATAC
GCAACTCGGTGCGCCGATACATATTCTCAGATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAGAGATATTGAGTGTGCCATACCATGAGTGATAC
GCAACTCGGTGCGCCGATACATATTCTCAGATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAGAGATATTGAGTGTGCCATACCATGAGTGATAC

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520

TEM
Eh, TEM
Consensus
ACTGCTGCCACTTACTTCTGACACGATCGGAGGACCGAGGAGCTAACCGCTTTTGGCACACACTGGGGGATCATGTACTCGCTTATCGTTGGGAACCGGAGCTGARTGAGGCAATACCAAGC
ACTGCTGCCACTTACTTCTGACACGATCGGAGGACCGAGGAGCTAACCGCTTTTGGCACACACTGGGGGATCATGTACTCGCTTATCGTTGGGAACCGGAGCTGARTGAGGCAATACCAAGC
ACTGCTGCCACTTACTTCTGACACGATCGGAGGACCGAGGAGCTAACCGCTTTTGGCACACACTGGGGGATCATGTACTCGCTTATCGTTGGGAACCGGAGCTGARTGAGGCAATACCAAGC

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650

TEM
Eh, TEM
Consensus
ACGAGCTGACACCAAGTGCCTGACGATGGCAGACAGCTTGGCGAATATTACTGGCGAATCTTACTTAGCTTCCCGGCACATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAGATTGAGGAGCC
ACGAGCTGACACCAAGTGCCTGACGATGGCAGACAGCTTGGCGAATATTACTGGCGAATCTTACTTAGCTTCCCGGCACATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAGATTGAGGAGCC
ACGAGCTGACACCAAGTGCCTGACGATGGCAGACAGCTTGGCGAATATTACTGGCGAATCTTACTTAGCTTCCCGGCACATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAGATTGAGGAGCC

651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780

TEM
Eh, TEM
Consensus
ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGCGTGGCTGGTTTATGCTGATTAATCTGGAGCGGTGAGCGTGGGCTCGCGGTATCATTTGACGACTGGGGCCAGATGGTAGCCCTCCGATCTGATGATTATCTAC
ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGCGTGGCTGGTTTATGCTGATTAATCTGGAGCGGTGAGCGTGGGCTCGCGGTATCATTTGACGACTGGGGCCAGATGGTAGCCCTCCGATCTGATGATTATCTAC
ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGCGTGGCTGGTTTATGCTGATTAATCTGGAGCGGTGAGCGTGGGCTCGCGGTATCATTTGACGACTGGGGCCAGATGGTAGCCCTCCGATCTGATGATTATCTAC

781 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 888

TEM
Eh, TEM
Consensus
ACGACGGGGAGTCAGGCACATGAGTATGACGAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAGTATTAGCATTGGTAA
ACGACGGGGAGTCAGGCACATGAGTATGACGAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAGTAAAGGGGGGGTGTGGTGGTGGAAATAGGAGACCCAC
ACGACGGGGAGTCAGGCACATGAGTATGACGAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC.CGTAAAGGGGGGGTGTGGTGGTGGAAATAGGAGACCCAC.....

*bla*_{TEM-1} زن Alignment : تصویر ۵-۵

جدول ۵-۶: توزیع فراوانی ایزوله های حامل ژن های حامل ژنهای *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} بر حسب بخش های بیمارستان های

مورد مطالعه

ژن	بخش (%)						
	مراقبت های ویژه	داخلی	جراحی	جراحی اعصاب	اعصاب	عفونی	مجموع
<i>bla</i> _{SHV-1}	۲ (%۴۰)	۰	۰	۰	۰	۳ (%۶۰)	۵ (%۱۰۰)
<i>bla</i> _{SHV-12}	۰	۳ (%۱۰۰)	۰	۰	۰	۰	۳ (%۱۰۰)
<i>bla</i> _{TEM-1}	۹ (%۴۵)	۶ (%۳۰)	۰	۱ (%۵)	۰	۴ (%۲۰)	۲۰ (%۱۰۰)

۵-۸- REP-PCR

بررسی نتایج آزمون REP-PCR نشان داد که در مجموع ایزوله های مولد ESBL در این مطالعه متعلق به

۴ کلون به ترتیب A (۳۶-/%۴۸)، B (۲۵-/%۳۳)، C (۱۰-/%۱۳/۳) و D (۴-/%۵/۳) بودند. تعداد و درصد

کلونهای جدا سازی شده در این مطالعه در جدول ۴-۷ مختلف آمده است.

جدول ۵-۷: نتایج حاصل از آزمون REP-PCR در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مولد ESBL

کلون	تعداد	درصد
A	۳۶	(%۴۸)
B	۲۵	(%۳۳/۳)
C	۱۰	(%۱۳/۳)
D	۴	(%۵/۳)
جمع کل	۷۵	۱۰۰

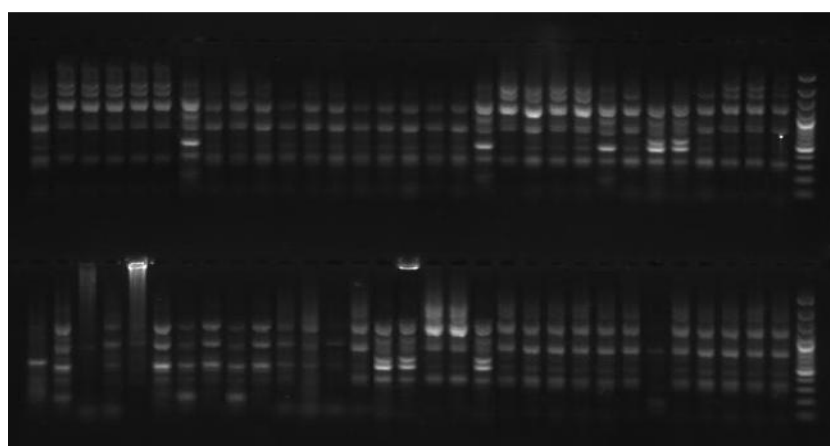
همچنین مشخص شد که بیشتر ایزوله های تولید کننده ESBL مربوط به کلونهای شناسایی شده در این

مطالعه از بیمارستان بوعلی قزوین (%۴۹/۳) جداسازی شدند. جدول ۴-۸ توزیع فراوانی کلونهای جدا سازی

شده در این مطالعه را از مراکز مختلف بیمارستانی مورد مطالعه را نشان می دهد.

جدول ۵-۸: فراوانی کلونهای جدا سازی شده مختلف حاصل از آزمون REP-PCR در مراکز بیمارستانی این مطالعه

کلون	بیمارستان					مجموع
	امام حسین	رجایی	قدس	کوثر	بوعلی	
A	۶ (%/۸)	۳ (%/۴)	۰ (%/۰)	۱۰ (%/۱۳/۳)	۱۷ (%/۲۲/۷)	۳۶
B	۱۰ (%/۱۳/۳)	۱ (%/۱/۳)	۱ (%/۱/۳)	۴ (%/۵/۳)	۹ (%/۱۲)	۲۵
C	۱ (%/۱/۳)	۰ (%/۰)	۰ (%/۰)	۱ (%/۱/۳)	۸ (%/۱۰/۷)	۱۰
D	۱ (%/۱/۳)	۰ (%/۰)	۰ (%/۰)	۰ (%/۰)	۳ (%/۴)	۴
جمع کل	۱۸ (%/۲۴)	۴ (%/۵/۳)	۱ (%/۱/۳)	۱۵ (%/۲۰)	۳۷ (%/۴۹/۳)	۷۵



تصویر ۵-۷: نتیجه آزمون REP-PCR مربوط به نمونه های ESBL مثبت در این مطالعه

در ادامه با بررسی حضور ژنهای جدا سازی شده در کلونهای مختلف مشخص شد که ژن *bla*_{TEM-1} به ترتیب بیشتر از کلون A (%/۱۴/۷) و B (%/۸) جداسازی شدند. همچنین ژن *bla*_{SHV-1} بیشتر از کلونهای A (%/۴) و B (%/۲/۷) جدا سازی گردید. همچنین ژن *bla*_{SHV-12} بیشتر از ایزوله های متعلق به نوع B (%/۲/۷) جدا سازی شد.

جدول ۵-۹: توزیع فراوانی ژن *bla*_{TEM-1} در ایزوله های متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه

کلون	ژن <i>bla</i> _{TEM}		مجموع
	مثبت	منفی	
A	۱۱ (%۱۴/۷)	۲۵ (%۳۳/۳)	۳۶ (%۴۸)
B	۶ (%۸)	۱۹ (%۲۵/۳)	۲۵ (%۳۳/۳)
C	۲ (%۲/۷)	۸ (%۱۰/۷)	۱۰ (%۱۳/۳)
D	۱ (%۱/۳)	۳ (%۴)	۴ (%۵/۳)
جمع کل	۲۰ (%۲۶/۷)	۵۵ (%۷۳/۳)	۷۵ (%۱۰۰)

جدول ۵-۱۰: توزیع فراوانی ژن *bla*_{SHV-1} در ایزوله های متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه

کلون	ژن <i>bla</i> _{SHV-1}		مجموع
	مثبت	منفی	
A	۳ (%۴)	۳۳ (%۴۴)	۳۶ (%۴۸)
B	۲ (%۲/۷)	۲۳ (%۳۰/۷)	۲۵ (%۳۳/۳)
C	۰ (%۰)	۱۰ (%۱۳/۳)	۱۰ (%۱۳/۳)
D	۰ (%۰)	۴ (%۵/۳)	۴ (%۵/۳)
جمع کل	۵ (%۶/۷)	۷۰ (%۹۳/۳)	۷۵ (%۱۰۰)

جدول ۵-۱۱: توزیع فراوانی ژن *bla*_{SHV-12} در ایزوله های متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه

کلون	ژن <i>bla</i> _{SHV-12}		مجموع
	مثبت	منفی	
A	۱ (%۱/۳)	۳۵ (%۴۶/۷)	۳۶ (%۴۸)
B	۲ (%۲/۷)	۲۳ (%۳۰/۷)	۲۵ (%۳۳/۳)
C	۰ (%۰)	۱۰ (%۱۳/۳)	۱۰ (%۱۳/۳)
D	۰ (%۰)	۴ (%۵/۳)	۴ (%۵/۳)
جمع کل	۳ (%۴)	۷۲ (%۹۶)	۷۵ (%۱۰۰)

فصل ششم

بحث ونتیجه گیری

سودوموناس آئروژینوزا یکی از علل اصلی عفونتهای بیمارستانی شامل پنومونی، عفونت ادراری و باکتری می است. این عفونتها بویژه در بیماران با نقص ایمنی مانند بیماران نوتروپنی یا سرطانی مشاهده می شود. این ارگانیزم یک علت شایع مرگ و میر در بیماران بستری و دچار نقص ایمنی است (۱۰۲). بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیکی انجام شده در سراسر جهان اثبات شده است که میزان شیوع الگوهای مختلف مقاومت دارویی در سویه های سودوموناس آئروژینوزا از یک کشور تا کشور دیگر، از یک منطقه جغرافیایی تا منطقه جغرافیایی دیگر و حتی ما بین بیمارستان های مختلف یک ناحیه جغرافیایی می تواند متفاوت باشد (۱۰۳). علیرغم دستاوردهای زیاد در سیستم های مراقبت بیمارستانی و معرفی طیف گسترده ای از عوامل ضد میکروبی، این باکتری همچنان از عوامل رایج ایجاد کننده عفونت در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان می باشد (۱۰۴). در حال حاضر مقاومت های آنتی بیوتیکی و علت های آن خیلی مورد توجه است و در موارد بسیاری درمان بیماران با شکست روبرو شده است. با توجه به مقاومت روز افزون این باکتری به دارو های ضد باکتریائی و به خصوص نسبت به ترکیبات بتالاکتام اهمیت مقاومت آن دو چندان می شود. درمان سودوموناس آئروژینوزا به علت وجود مقاومت ذاتی و اکتسابی نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج مورد استفاده در بیمارستان به طور فزاینده ای پیچیده شده است (۱۰۵). نه تنها این باکتری ها به صورت ذاتی به دامنه وسیعی از آنتی بیوتیک ها مقاومند، بلکه توانایی افزایش مقاومت را هنگام درمان کسب می کنند (۱۰۶). بتالاکتاماز های وسیع الطیف (ESBLs) آنزیم هایی هستند که عامل مقاومت به سفالوسپورینهای گسترده طیف مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفنازیدیم می باشند. چنین آنزیم هایی معمولا در کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکولی یافت می شوند و اخیرا با شیوع کمتر در سودوموناس آئروژینوزا یافت شده اند (۱۰۷).

شناسایی تولید ESBLs مهم می باشد. یک نگرانی مهم، گسترش باکتری های مولد ESBLs در بیمارستانها می باشد که منجر به گسترش قابل ملاحظه آنها می گردد. دیگر نگرانی مهم در این زمینه شکست در درمان به دنبال ابتلا عفونت های ناشی از ارگانیزم های مقاوم به علت انتخابهای درمانی محدود می باشد (۱۰۸). استفاده بی رویه یا اشتباه از آنتی بیوتیک های ضد سودوموناسی منجر به ایجاد سویه های (Multidrug MDR resistance) شده که موجب محدودیت در انتخاب داروهای مناسب جهت درمان شده است

(۱۰۸ و ۱۰۹). در حال حاضر ظهور ESBLs یک موضوع نگرانی جدی برای پزشکان و متخصصان کنترل عفونت محسوب می شود.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، بیشترین درصد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های به کار رفته در این مطالعه مربوط به سفپودوکسیم با (۹۸/۵٪) درصد و سفوتاکسیم با (۵۳٪) درصد گزارش گردید. طی مطالعاتی که صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۰۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از بیمارستان های مختلف شهر اراک انجام دادند، ۴۰ ایزوله مقاوم به ایمی پنم بودند. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، ایمی پنم، جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۱۱/۱٪، ۳۷٪، ۱۵/۷٪، ۲۹/۶٪ و ۱۷/۶٪ گزارش شد (۸۷). در مطالعه دیگری که توسط فولادی و همکاران در سال ۸۹ انجام گرفت میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون به ترتیب برابر با ۴۳/۶٪، ۲۰/۹٪، ۶۶/۴٪ بود. در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، تتراسیکلین، جنتامایسین به ترتیب برابر ۱۷/۳٪، ۸۶/۴٪ و ۲۵/۵٪ گزارش گردید (۸۸). در مطالعه ای که صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم برابر با (۷۳٪) بود. در ضمن در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، جنتامایسین، و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۷۳٪، ۸۶٪، و ۵۵٪ گزارش گردید (۸۹). در مطالعه حاضر از مجموع ۲۶۶ ایزوله بالینی جدا شده، تعداد ۷۵ ایزوله (۲۸/۶٪) دارای الگوی فنوتیپی تولید ESBLs مثبت بودند. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ توسط فرشاد زاده و همکاران در اهواز انجام پذیرفت از مجموع ۱۸۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی تعداد ۹۶ ایزوله (۵۱/۹٪) فنوتیپ ESBLs مثبت را نشان دادند (۹۲). در سایر نقاط جهان، نتایج مطالعه حاضر از آمار پایین تری برخوردار بود به طوری که در مطالعه Begum و همکاران در بنگلادش در سال ۲۰۱۳ مقدار ایزوله های دارای فنوتیپ ESBLs مثبت برابر ۳۷/۸٪ گزارش گردید (۱۱۰). همچنین در مطالعه Senthamaria و همکاران این میزان برابر با ۴۲/۳٪ گزارش گردید (۱۱۱). در مطالعه دیگری که توسط Zafar و همکاران در مصر انجام گرفت میزان ایزوله های دارای الگوی فنوتیپی ESBLs برابر با ۷/۴٪ گزارش گردید (۱۱۲). در مطالعه ای که Umadevi و همکاران در سال ۲۰۱۱ در هند انجام دادند میزان ایزوله های ESBLs مثبت برابر با ۱۹/۴٪ گزارش گردید (۱۱۳). در مطالعه دیگری که توسط Woodford و

همکاران در انگلستان صورت پذیرفت این مقدار (۳/۷٪) گزارش گردید که پایین تر از مقدار گزارش شده در این مطالعه بود (۱۱۴). در مطالعه ای که در سالهای ۲۰۰۹ توسط Ullah و همکارانش در پاکستان انجام شد از مجموع ۱۰۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران بخش سوختگی، ۳۸ ایزوله ۳۸/۸۵٪ از این نمونه ها دارای الگوی فنوتیپی ESBLs بودند (۹۳). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که ایزوله های سودوموناس ESBLs مثبت به ترتیب از نمونه های بالینی خون (۳۲٪) و ادرار (۲۲/۷٪) جداسازی گردیدند. به نظر می رسد استفاده از ابزارهای تهاجمی از جمله کاتترهای ادراری، وریدی در بروز و انتشار عفونت های ناشی از این ارگانیسم های مقاوم نقش دارد. همچنین در این مطالعه اکثر ایزوله های سودوموناس ESBLs مثبت از بیماران بستری در بخشهای مراقبت ویژه (۴۴٪) و داخلی (۲۵/۳٪) جمع آوری شدند. بستری طولانی مدت بیماران در بخش های بحرانی بیمارستانی از جمله ICU، وخیم بودن حال بیماران، مواجهه بیماران با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و به کار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی مثل تراشه و کاتتر می تواند از دلایل عمده شیوع ارگانیزمهای مقاوم باشد.

با انجام آزمون PCR بر روی ایزوله های تولید کننده ESBLs از مجموع ۷۵ (۲۸/۶٪) ایزوله سودوموناس آئروژینوزای مولد ESBLs، ۲۰ ایزوله (۲۶/۷٪) حامل ژن *bla*_{TEM} و ۸ ایزوله (۱۰/۷٪) حامل ژن *bla*_{SHV} بودند. در ادامه با تعیین توالی ژنهای جداسازی شده نمونه ها مشخص گردید که تمام ایزوله های دارای ژن *bla*_{TEM} از نوع *bla*_{TEM-1} و ایزوله های مولد *bla*_{SHV} از نوع *bla*_{SHV-1} (۶/۷٪) و *bla*_{SHV-12} (۴٪) بودند. در مطالعه ای که توسط شجاعپور و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی تولید ESBLs در ۱۷۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از ایزوله های بالینی پرداختند، مشخص شد که ۶۶ ایزوله ۳۷/۷٪ دارای الگوی ESBLs مثبت بودند که از این میزان، ۱۰ ایزوله (۱۵/۱۵٪) واجد ژن *bla*_{TEM-1} بودند (۹۴). همچنین در مطالعه ای که توسط بهمنی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی ۱۲۳ نمونه کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت، ۲۲ ایزوله (۱۷/۸۹٪) تولید کننده ESBLs بودند که با انجام آزمون PCR، ۱۲ ایزوله ۱۰/۷۵٪ دارای ژن *bla*_{SHV} بودند (۹۶). در بررسی که در سال ۲۰۰۹ توسط شاهچراغی و همکاران بر روی ۶۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از دو بیمارستان در تهران انجام شد ژنهای *bla*_{TEM}، *bla*_{PER} و *bla*_{VEB} مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به آزمون PCR به ترتیب ۲۲٪، ۹٪، ۱۷٪،

۲۴٪ از ایزوله ها دارای ژنهای بتالاکتاماز bla_{SHV} ، bla_{TEM} ، bla_{PER} ، bla_{VEB} بودند (۹۷). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Lee و همکاران در کره جنوبی بر روی ۲۵۲ نمونه بالینی سودوموناس آئروژینوزا جهت تشخیص ژنهای bla_{TEM} و bla_{SHV} صورت پذیرفت حضور این ژنها شناسایی نگردید. در این مطالعه ژن bla_{PSE-1} (۶/۳٪) و ژن bla_{OXA-10} (۱۳/۱٪) جداسازی شدند (۹۸).

در مجموع ایزوله های تولید کننده ESBL مربوط به ۴ کلون (A-D) بودند که مشخص گردید بیشتر ایزوله ها مربوط به کلون های A (۴۸٪) و کلون B (۳۳/۳٪) بودند که حاکی از انتشار کلونال ایزوله های مولد ESBL در بیمارستانهای مورد مطالعه است. انتشار کلونال ایزوله های مولد ESBL در سایر مطالعات در ایران و سایر نقاط جهان نیز گزارش شده است. که نیازمند توجه و به کارگیری مناسب ابزارهای کنترل عفونت جمعیت جهت کنترل انتشار هر چه بیشتر آنهاست.

نتیجه گیری:

توجه به حضور قابل توجه ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مولد ESBL و الگوی افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا لزوم تشخیص این آنزیم ها و تعیین الگوی دقیق حساسیت آنتی بیوتیکی این ایزوله ها جهت گزارش به بالین و اعمال راهکارهای مناسب درمانی و کنترل عفونت ضروری می باشد.

پیشنهادهای:

۱- پیشنهاد می گردد سایر ژنهای کد کننده ESBL از جمله PER، VEB و CTX-M مورد بررسی قرار گیرند.

۲- تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به سایر آنتی بیوتیک های مصرفی و بررسی فاکتورهای ملکولی کد کننده آنها ضروری است.

منايع و ماخذ

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, &Adelberg's medical microbiology: McGraw-Hill Medical New York, NY, USA; 2013: p. 216-226.
2. Washington C. Winn, Stephen D. Allen, Stephen Allen, William M Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gary W. Procop, Gail L. Koneman's color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology, Gail Woods, 6th Edition, 2006.p;256-285.
3. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity.2011; 13; 2:150.
4. Palleroni NJ. *Pseudomonas*. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 2006.
5. Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. J Clin Microbiol. 2001 Jun;39(6):2072-8.
6. Pitt,T.L, Simpson, A.J.H. Principles and Practice of Clinical Bacteriology.2nded. 2006. P:427-443.
7. Mandell GL. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 2005: p. 1023-35.
8. Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and practice of clinical bacteriology: Wiley Online Library; 2006: p. 421-43.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology: with STUDENT CONSULT Online Access: Elsevier Health Sciences; 2013: p. 421-43.

10. Grage K, Rehm BH. In vivo production of scFv-displaying biopolymer beads using a self-assembly-promoting fusion partner. 2008;19(1):254-62.
11. Hancock RE, Brinkman FS. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. Annu Rev Microbiol. 2002;56:17-38.
12. Biswas S, Mohammad MM, Patel DR, Movileanu L, van den Berg B. Structural insight into OprD substrate specificity. Nat Struct Mol Biol. 2007;14(11):1108-9.
13. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM .Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. 2012;302(2):63-8.
14. Ochs MM, Bains M, Hancock RE. Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(7):1983-5.
15. Tamber S, Hancock RE. Involvement of two related porins, OprD and OpdP, in the uptake of arginine by *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 2006;260(1):23-9
16. Murate T, Gotoh N, Nishino T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. FEMS Microbiol Lett. 2002; 217(1): 57063.
17. Chevalier S, Bodilis J, Jaouen T, Barray S, Feuilloley MG, Orange N. Sequence diversity of the OprD protein of environmental *Pseudomonas* strains. Environ Microbiol. 2007;9(3):824-35.

18. Pirnay JP, De Vos D, Mossialos D, Vanderkelen A, Cornelis P, Zizi M. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol.* 2002;4(12):872-82.
19. Farra A, Islam S, Strålfors A, Sörberg M, Wretling B. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(5):427-33.
20. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 2007; 67:351-368.
21. Caille O, Rossier C, Perron K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2007;189(13):4561-8.
22. Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Köhler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 2004 5;279(10):8761-8.
23. Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1211-21.
24. Kwon DH, Lu CD. Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2070-7.
25. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. 2012;36(4):893-916.
26. Ojeniyi B, Frederiksen B, Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection among patients with cystic fibrosis during a winter camp. *Pediatr Pulmonol.* 2000;29(3):177-81.

27. Wagner VE, Iglewski BH. *P.aerogiosa* Biofilms in CF Infection. Clin Rev Allergy Immunol. 2008;35(3):124-34.
28. Pritt B, O'Brien L, Winn W. Mucoid *Pseudomonas* in cystic fibrosis. 2007;128(1):32-4.
29. Nowroozi J, Akhavan Sepahi A, Rashnonejad A. Pyocyanine Biosynthetic Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Detection of Pyocyanine's Antimicrobial Effects with or without Colloidal Silver Nanoparticles. 2012;14(1):7-18.
30. Sudhakar T, Karpagam S and Shiyama S. Analysis Of Pyocyanin Compound And Its Antagonistic Activity Against Phytopathogens. 2013;3:p1101-1106.
31. Forbes BA, SahmDF, Weissfeld AS, TrevionEA. Bailey & scotts. Diagnostic Microbiology. 12thed. st.LouisMO, Elsevier Mosby;2007.385-405.
32. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, prebe GP, pier GB: "Acquisition of expression of the pseudomonas aeruginosa ExoU cytotoxin. Leads to increased bacterial virulence in a murine model of a cute pneumonia and systemic spread."Infection and immunity. 2000;68:3998-4004.
33. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. Front Microbiol. 2011;2:150.
34. Mandell GL. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 2005.
35. Molina DN, Colón M, Bermúdez RH, Ramírez Ronda CH. Unusual presentation of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a review. Bol Asoc Méd P R. 1991;83(4):160-3.
36. Beckett G, Williams D, Giberson G, Gensheimer K, Gershman K, Shillam P, et al. *Pseudomonas* dermatitis/folliculitis associated with pools and hot tubs-

- Colorado and Maine, 1999-2000. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2000;49(48):1087-91.
37. Willcox MD, Holden BA. Contact lens related corneal infections. Biosci Rep. 2001 Aug;21(4):445-61.
 38. Mowat G. An international collaborative study on foot and mouth disease virus assay methods. 1. Virus infectivity and neutralizing antibody assays. Journal of biological standardization. 2004;12(4):399-411.
 39. Eifrig CW, Scott IU, Flynn HW, Jr., Miller D. Endophthalmitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Ophthalmology. 2003 Sep;110(9):1714-7.
 40. Rajashekaraiah K, Dhawan VK, Rice TW, McCulley D, Kallick CA. Increasing incidence of *Pseudomonas* endocarditis among parenteral drug abusers. Drug and Alcohol Dependence. 2000;6(4):227-30.
 41. Berthelot P, Grattard F, Mahul P, Pain P, Jospe R, Venet C, et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. Intensive Care Med. 2001 Mar;27(3):503-12.
 42. Edwards-Jones V, Greenwood JE. What's new in burn microbiology? James Laing Memorial Prize Essay 2000. Burns. 2003 Feb;29(1):15-24.
 43. Morrison AJ, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Review of Infectious Diseases. 2004;6(Supplement 3):S627-S42.
 44. Ryan KJ, Ray CG. Sherris medical microbiology: McGraw Hill Medical; 2010.
 45. Sonensyn SW , Gerding DN. Antimicrobials for treatment of respiratory infection in respiratory infection. 2000;43:511-519.
 46. Paul M, Lador A, Grozinsky-Glasberg S, Leibovici L. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. Cochrane Database Syst Rev. 2014;1:Cd003344.

47. Tang Y-W, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clinical Chemistry*. 1997;43(11):2021-38.
48. Baron EJ. Conventional versus Molecular Methods for Pathogen Detection and the Role of Clinical Microbiology in Infection Control. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(9 Supplement):S43-S.
49. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 2010;262(4):56-61.
50. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. 2007;155:335.
51. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis*. 2003 Feb;7(1):32-43.
52. Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*. 2002 Nov;8(11):694-704.
53. Baek KT, Frees D, Renzoni A, Barras C, Rodriguez N, Manzano C, Kelley WL. Genetic Variation in the *Staphylococcus aureus* 8325 Strain Lineage Revealed by Whole-Genome Sequencing. *PLoS One*. 2013 Sep 30;8(9):e77122.
54. Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res*. 2005 Nov;5(4):408-18.
55. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jul;19(3):512-30.

56. Clark NM, Patterson J, Lynch JP 3rd. Antimicrobial resistance among, gram-negative organisms in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care*. 2003;9(5):413-23.
57. Guglielmo B.J, editor . Infectious disorder. In: Koda-Kimble M.A, Young L.Y, Kradjan W, A Guglielmo B.J, Alldredge BK, Corelli R.L, editors. *Applied therapeutics, the Clinical use of drugs*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005. P.56.23-4.
58. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm. 2005;18(2):306-25.
59. Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini GM. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(5):910-1.
60. Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(5):436-40.
61. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003; 6;362(9399):1888-93.
62. Kim C, Villegas-Estrada A, Hessek D, Mobashery S. Mechanistic characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. 2007 ;1;46(17):5270-82.

63. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. B-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8:525-533.
64. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, et al. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(4):827-830.
65. Alm RA, Mattick JS. Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 2007;192(1):89-98.
66. Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 2008 Jul 3;273(27):16792-7.
67. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo-betalactamases: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2):30.
68. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(11):4783-4788.
69. Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital from a rural area. *Indian J Med Res.*2005; 121:701-703.
70. Fred CT. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American J Med.* 2006; 119 (6): 3–10.
71. Murray PR, Drew WI, Kobayash GS, Thompson JH. Medical microbiology. International Student Edition. 2009; p: 103-107.
72. Siegel MD, Robert E, Emerging Gram-Negative Antibiotic Resistance: Daunting Challenges, Declining Sensitivities, and Dire Consequences. *Respiratory Care.* 2008; 53: 4.

73. Hamud-Socoro AA. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to tetracycline and triclosan. *Cantaurus*. 2004; 12: 7-9.
74. Maschmeyer G, Braveny I. Review of the Incidence and prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients in the 1990s. *Eur J clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19: 915- 925.
75. Aeschlimann JR. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Society of Infectious. *Pharmacotherapy*. 2003; 23(7):916-924.
76. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*. 2008; 317:657-660.
77. Abigail AS, Dixie D. Revengooof the microbes; how bacterical resistance is under minning the antibiotic miracle. 2005; p: 80-90.
78. Barza M. Potential mechanisms of increased disease ishuments from antimicrobial resistance in food animals. *Clin Infeect Dis*. 2002; 34(3): 123–125.
79. Takeda S, Nakai T, Wakai Y, Ikeda F, Hatano K. In vitro and in vivo activities of a new cephalosporin, FR264205, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(3):826-30.
80. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S20. CLSI, Wayne, PA. 2010. 40: 2755-2759.
81. Fazeli H, Akbari R, Moghim S, Asadian A, Faghihinia J, Saneeyan H. Detection of morphotyping characteristics Identification antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *IUMS*. 2012;29(171):212-8.

82. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000 May 19;288(5469):1251-4.
83. Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat*. 2000 Aug;3(4):247-55.
84. Baltch A, Hammer M, Smith R, Sutphen N. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: susceptibility of 100 blood culture isolates to seven antimicrobial agents and its clinical significance. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2009;94(2):201-14.
85. Hodson ME. Antibiotic treatment aerosol therapy. *Chest Journal*. 2008;94(2_Supplement):156S-60S.
86. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*. 2011;2:150.
87. Sadeghi A, Rahimi B, Shojapour M. Molecular detection of metallo- β -lactamase genes *BlaVIM-1*, *blaVIM-2*, *blaIMP-1*, *blaIMP-2* and *blaSPM-1* in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from hospitalized patients in Markazi province by Duplex-PCR. *African J Microbiol* 2012; 6(12): 2965-2969.
88. Imani Fooladi AA, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBLprevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods, Zanjan, Iran. *Iranian J MedMicrobiol*. 2011; 10:189-198.
89. Saderi H, Lotfalipour H, Owlia P, Salimi H. Detection of Metallo- β -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients in Tehran, Iran. 2010; 41:10.

90. Sibhghatulla Shaikh, Jamale Fatima, Shazi Shakil, Syed Mohd. Danish Rizvi, Mohammad Amjad Kamal. Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. Saudi Journal of Biological Sciences. 2014;1: 62–64.
91. Rehab Mahmoud Abd El-Baky, Nehal Hussein Abd El-Azeim and Gamal Fadl Mahmoud Gad. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase, AmpC Beta-Lactamase, and Metallo-Beta-Lactamase among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering. 2013; 1: 22-29.
92. Farshadzadeh Z, Khosravi AD, Alavi SM, Parhizgari N, Hoveizavi H. Spread of extended-spectrum β -lactamase genes of blaOXA-10, blaPER-1 and blaCTX-M in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Burns. 2014;40(8):1575- 80.
93. Farhat Ullah, Salman Akbar Malik, Jawad Ahmed. Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the North West of Pakistan. Burns. 2009;35:1020-1025.
94. Shojapour M, Shariati L, Karimi A, Zamanzad B. Prevalence of TEM-1 type beta-lactmase genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn infections using Duplex PCR in Shahrekord, 2008. Arak Medical University Journal (AMUJ) Original Article. 2011; 14(54): 55-61.
95. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(9):2990-5.
96. Bahmani N, Ramazanzadeh R. Detection of SHV type Extended-Spectrum B-lactamase and Risk Factors in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. Pak J Med Sci. 2013;29(3):788-92.

97. Shahcheraghi F1, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran. Microb Drug Resist. 2009 Mar;15(1):37-9.
98. Lee S1, Park YJ, Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, Kang MW. Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. J Antimicrob Chemother. 2005;56(1):122-7.
99. Vahdani M1, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, Rastegar Lari A. Phenotypic screening of extended-spectrum β -lactamase and metallo- β -lactamase in multidrug-resistant *Peudomonas aeruginosa* from infected burns. Ann Burns Fire Disasters. 2012; 30:78-81.
100. Naiemi NA, Duim B, Savelkoul PH, Spanjaard L, de Jonge E, Bart A, Vandenbroucke-Grauls CM, de Jong MD. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. J Clin Microbiol. 2005; 43(9):4862-4.
101. Aghazadeh M, Rezaee MA, Nahaei MR, Mahdian R, Pajand O, Saffari F, et al. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Microb Drug Resist. 2013;19(4):282-8.
102. Erol S,Altöparlak U, Akcay MN, Celebi F , Parlak M. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. Burns. 2004; 30(4):357-61.
103. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005;18(2):306-25.
104. Shih-Ping Lin ,Meei-Fang Liu, Chin-Fu Lin, Zhi-Yuan Shi. Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum b-

- lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Ann Burns Fire Disasters. 2012; 30:78-81.
105. Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B, Purighalla S, Norgaard-Gron JC, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. 2013;8(4):248-252.
 106. Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang TD, Van Eldere J, et al. Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. J Antimicrob Chemother. 2010;65(5):866-71.
 107. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Updat. 2006;9(3):142-56.
 108. Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini GM. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. 2001;7(5):910-1
 109. Moya, B., Zamorano, L., Juan, C., Pérez, J.L., Ge, Y., Oliver, A. Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. Antimicrob. Agents Chemother. 2010; 54, 1213–1217.
 110. Begum S.Salam MA, Alam KF, Begum N, Hassan P, Haq JA. Detection of extended spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas spp.* isolated from two tertiary care hospitals in Bangladesh. BMC Research Notes. 2013;6(1):7.
 111. S S, Reddy AS, S S, C A, V S, Ms K, et al. Resistance Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary Care Hospital of Kanchipuram, Tamilnadu, India. J Clin Diagn Res. 2014;8(5):Dc30-2.

112. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, Ashour MS. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cancer patients. Biomed Res Int. 2014;2014:101635.
113. Umadevi S, Joseph NM, Kumari K, Easow JM, Kumar S, Stephen S, et al. Detection of extended spectrum beta lactamases, ampc beta lactamases and metallobetalactamases in clinical isolates of ceftazidime resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. Braz J Microbiol. 2011;42(4):1284-8.
114. Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, Yarde S, Tomas Mdel M, Faris C, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother. 2008;62(6):1265-8.

Introduction and Objectives : *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen causing nosocomial infections, such as pneumonia, urinary tract infection, sepsis, burn and wound infections. Several studies have shown that extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *P. aeruginosa* are rapidly increasing worldwide. The aim of this study was to determine frequency of *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes using the phenotypic and molecular methods.

Materials and Methods : In this study, 266 *P. aeruginosa* isolates were collected from patients in Qazvin and Tehran hospitals. All isolates were initially screened for ESBL-production by disk diffusion method according to CLSI guideline and then were confirmed by a combination disk method. PCR and sequencing assay were performed for the presence of *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes. All producing isolates were typed by REP-PCR for colonicity assessment.

Result : Of 266 isolates, 75 isolates (28.6%) were positive for ESBL production among which 5 isolates (6.7%) for *bla*_{SHV-1}, and 3 isolates (4%) + 20 (26.7%) isolates were positive for *bla*_{TEM-1} for *bla*_{SHV-12} gene. REP-PCR showed that ESBL-producing isolates were belonged to 4 clones among that clone A (48%) and clone B (33%) were the most prevalent in this study.

Conclusion : Considering the high frequency of extended spectrum β -lactamases producing isolates in the hospitals, initial identification and following of them are necessary to prevent more spread in the hospitals. The appropriate treatment methods and the rational use of antibiotics are also important.

Keyword : *Pseudomonas aeruginosa*, ESBL, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}

ضمیمه

تهیه نیم مک فارلند : استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریوم به روش زیر تهیه می شود :

۰/۵ میلی لیتر از کلرور باریوم (BACL) ۰/۴۸ mol/l (۱/۱۷۵ W/VBaCl₂2H₂O) را به ۹۹/۵ میلی لیتر اسید

سولفوریک ۰/۱۸ mol/l (V/V 1%) اضافه کنید و با هم زدن مداوم سوسپانسیون بدست آورید .

۱. چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکتروفوتومتر با طول مسیر

نوری ۱ سانتی متر، مشخص شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

۲. سوسپانسیون سولفات باریوم باید به مقدار ۴-۶ ml در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های

سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

۳. درب این لوله ها باید محکم بسته شود و در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شود .

۴. استاندارد سولفات باریوم قبل از هر بار استفاده باید بشدت (ترجیحا با ورتکس مکانیکی) همزده شود،

تا کدورت یکنواختی ایجاد گردد. در صورت مشاهده ذرات بزرگ، باید استاندارد تازه ای تهیه گردد.

۵. استاندارد سولفات باریوم باید بصورت ماهانه جایگزین شود یا جذب آن اندازه گیری گردد.

ضمیمه ۲

TBE بافر: ۵۴ گرم تریس را با ۲۷/۵ گرم بوریک اسید در ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده سپس ۲۰

میلی لیتر EDTA (۰/۵ مولار) به آن اضافه کرده و حجم را به یک لیتر میرسانیم.

ضمیمه ۳

EDTA (۰/۵ مولار): ۱۸/۱۶ گرم EDTA در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و pH را با استفاده از

NaOH به ۸ رسانده و سپس توسط اتوکلاو استریل میکنیم.



Qazvin University of Medical Sciences

School of Medicine

Degree)M. Sc(A Theses Submitted for

**Frequency of ESBLs TEM, SHV and molecular typing
REP-PCR in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Hospitals in Qazvin and
Tehran**

Supervisor:

Dr.Amir Peymani

2014-2015

Advisor:

Dr.Amir Javadi

By:Ehsan Zare

